Untersuchungen über die Früchte von Carduus marianus

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Willfried Berg
aus Geislingen Stg.

München 1938

Untersuchungen über die Früchte von Carduus marianus

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Willfried Berg
aus Geislingen Stg.

München 1938

Berichterstatter: Professor Dr. F. Schlemmer
Tag der mündlichen Prüfung: 10. Februar 1938

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meiner lieben Mutter
und dem Andenken meines Vaters

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre (Pharmakognostische Anstalt) der Universität München, das unter Leitung von Herrn Professor Dr. F. S c h l e m m e r steht, in der Zeit von Sommer-Semester 1936 bis Winter-Semester 1937/38 ausgeführt.

Die Anregung zu der Arbeit erhielt ich von Herrn Professor Dr. F. S c h l e m m e r , der die Arbeit auch leitete und mir bei ihrer Ausführung mit seinem Rat stets in liebenswürdiger Weise zur Seite stand.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, meinem hochverehrten Lehrer, für das Wohlwollen und Interesse, das er meinen Studien jederzeit entgegenbrachte, auch an dieser Stelle herzlichst zu danken.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548304_0160

Inhaltsverzeichnis.

Seite

Einleitung: Die Geschichte der Mariendistel als Heilpflanze und die Anwendungsgebiete in der Medizin. Zweck der vorliegenden Arbeit 1

Ausführung.

I. Pharmakognostisch-botanische Untersuchung 5

II. Chemische Aufarbeitung.

A. Voruntersuchungen 9

1) Qualitative Vorprüfung 10
a) Prüfung eines wässrigen Auszugs 10
b) Prüfung eines salzsauren Auszugs 11
c) Extraktion mit neutralen Lösungsmitteln 12
d) Wasserdampfdestillation 14

2) Quantitative Prüfung und Bestimmung von Kennzahlen 15
a) Wassergehaltsbestimmung 15
b) Bestimmung der Asche 16
c) Fettes Öl 16
d) Eiweißbestimmung 18
e) Rohfaserbestimmung 18
f) Restbestandteile 21

B. Hauptuntersuchung. Prüfung auf bestimmte Verbindungsgruppen 22

1) Alkaloide 22
2) Glykoside 31
3) Saponine 34
a) Allgemeine Wertbestimmungsmethode 36
b) Blutgelatinemethode 37

4) Gerbstoffe 38

Seite

5) Bitterstoffe 43

a) Bleimethode 45
b) Tanninverfahren 46
c) Direkte Extraktionen 46
d) Aufeinanderfolgende Extraktion derselben Droge mit verschiedenen Lösungsmitteln 47
e) Tierkohle-Adsorptionsverfahren 52
f) Chromatographische Adsorptionsanalyse 55

6) Untersuchung der Schalen 57
7) Scharfe Substanz: Darstellung und Eigenschaften 58
8) Ätherisches Öl.

a) Darstellung 62
b) Physikalische Untersuchung 63
c) Chemische Untersuchung 64

9) Kohlehydrate 66
10) Amine: Chemische Untersuchung und biologischer Nachweis 69

Zusammenfassung 78

Einleitung.

Die Geschichte der Mariendistel als Heilpflanze und die Anwendungsgebiete in der Medizin. Zweck der vorliegenden Arbeit.

Carduus marianus oder Silybum marianum, Gärtner, ist eine sehr alte Heilpflanze. Schon Theophrast erwähnt sie, ebenso Plinius der Ältere und Pedanios Dioskurides (1). Letzterer schreibt in seiner Materia medica: „Das Silybon wird, noch jung, gekocht und mit Öl und Salz verspeist. Seine Wurzel, in der Menge von 1 Drachme mit Honigmeth getrunken, bewirkt Erbrechen."

Auch das Mittelalter nahm die Pflanze in den Arzneischatz auf. Die Äbtissin Hildegard von Bingen (12.Jahrh.) beschreibt sie als „Carduus albis maculis natata vulgaris" und als der Jungfrau Maria geweiht. Daher stammt die Bezeichnung Carduus marianus oder Mariendistel. Im Jahre 1590 wird sie von Joh. W i g a n d in seiner „Vera Historia" unter den kultivierten Heilkräutern aufgeführt. Aus der Mark Brandenburg erwähnt sie B e c m a n n im Jahre 1676. Den ersten genauen Bericht über „Krafft und Wirkung" erhalten wir von Peter von O f f e n b a c h (2) in seinem Kräuterbuch: „Wurzel und Samen von diesen Disteln sind warm und trucken, haben etwas zusammenziehende Natur. Ein Wasser von den Blättern gebraut, darvon getrunken, legt das Seitenstechen, allermeist, wenn man 1/2 Quintlein des gestoßenen Samen mit eintrinkt. Ist für alles Gift im Blut, der Pestilenz und anders.

---

1) Materia medica des Dioskurides, 77 n.Chr., gesammelt von Sprengel 1829, übersetzt von Berendes 1902, Seite 454.

2) Kreuterbuch, künstliche Conterfeytunge des Petrus Uffenbachius, Frankfurt 1679, Kap.27, Seite 190.

Tüchlin in dem Wasser genetzt und übergelegt ist es gut zu der entzündeten Leber, für Ohnmacht und Schwachheit." Es wurden also Wurzel, Kraut und Samen arzneilich verwendet, die Blätter ausserdem durch Auflegen auf schmerzende Stellen. Die Hauptbedeutung kommt aber wohl den Samen, besser Früchten zu, wie die weiteren Berichte ergeben. R a d e m a c h e r (von 1829-1849 Arzt) nahm die Pflanze in seine Erfahrungsheillehre als wichtiges Mittel auf und verwendete mit Vorliebe Abkochungen und vor allem eine Tinktur aus den Früchten. Er verordnete sie bei Steinleiden und allen anderen Gallenblasen- und Leberaffektionen. Er schreibt (1) selbst: „Beim tobenden Stein kommt kein Mittel dem Frauendistelsamen gleich." Weiterhin wurde die Droge von einem gewissen Dr. R e i l aus Halle der ersten Prüfung unterzogen; er nahm die Tinktur ein und suchte sich selbst eine Arzneikrankheit beizubringen. Die einzelnen Beschwerden beschrieb er genau (2) und kam zu dem Urteil, dass Carduus Mariae „vorzugsweise auf die Leber und nächst dieser auf die durch das Pfortadersystem vermittelte Blutbereitung, sodann auf die Schleimhäute der Intestina und der Brust wirken und sowohl chronischen als akuten Katarrhen der Brust- und Darmschleimhaut, alten Leber- und Milzleiden, sowie Affektionen der weiblichen Genitalien heilsam sei." Diese Beobachtungen wurden von Dr. A s s m a n n (3) (Dresden 1926) bestätigt. Er bezeichnet in einem späteren Aufsatz (1) Carduus marianus neben Chelidonium, Lycopodium, Podophyllum und Berberis als wichtigstes homöopathisches Gallen- und Lebermittel. Es wird ebenda berichtet, dass W e s t p h a l bei Verabreichung von 10-20 Tropfen der Urtinktur bei Duodenalsondierungen erst Hemmung des Abflusses durch Motilitätshemmung, dann starke

---

1) Allg.hom.Ztg. 1933, S.139.
2) Hom. Vierteljahresschr. 1852, S.483.
3) Deutsche Ztschr.f.Hom. 1929, Heft 3, S.60.

Anregung des Leber-Gallenflusses festgestellt habe. Das Mittel wirke sowohl choleretisch wie cholokinetisch. Auch in neuester Zeit wird von R a l l (1) diese Leberwirkung hervorgehoben. L o b a c h (2) berichtet von einer blutstillenden Wirkung der Samen bei übermäßiger Menstruation, chronischen Uterinblutungen und Melaena.

In Anbetracht dieser mannigfachen Anwendungsgebiete, von denen die alten Überlieferungen berichten, ist es verwunderlich, dass die Pflanze immer mehr in Vergessenheit geraten konnte. Um die Wende des 20. Jahrhunderts fand sie in der offiziellen Medizin fast nirgends mehr Erwähnung. Das hängt mit der allgemeinen Entwicklung der medizinischen Wissenschaft nach der Zeit der Aufklärung zusammen. Diese hatte den Zweifel zu ihrer besten Waffe erhoben, aus dem dann das wissenschaftliche Denken entsprang, und zwang dazu, Schluss zu machen mit der Erfahrung des Althergebrachten und „hinter die Dinge" zu sehen. Es entwickelte sich die chemische Analyse, mit deren Hilfe es gelang, die Stoffe auf ihren Inhalt zu untersuchen und so fand auch eine Umwertung der Heilmittel statt. Die Chemie wurde die beste Bundesgenossin der Medizin. Was ihrer Prüfung nicht standhielt, trat unbarmherzig in den Hintergrund, mochte noch so alte Tradition dahinterstecken. So wurde viel Spreu ausgesiebt und Ordnung geschaffen; allerdings ging aber auch manches Wertvolle verloren, was mit den damaligen Methoden noch nicht erkannt werden konnte. Die Entwicklung ging nun leider nicht dahin, die Spreu im Laufe der Zeit weiterhin zu sichten, sondern was einmal vergessen war, blieb in Vergessenheit. Aus den „anerkannten" Drogen wurden die wirksamen Stoffe isoliert und in der Therapie die Reinsubstanzen verwendet, die weiterhin mit dem Fortschritt der chemischen Wissenschaft synthetisch

---

1) Hippokrates 1937, Nr.32, S.802.
2) Verhandl.d.phys.-med.Ges., Würzburg 1858, 8, 288.

hergestellt wurden. Damit rückte die Arzneipflanze selbst immer mehr in den Hintergrund. Ja, man fand organische Verbindungen, die nicht in der Natur vorgebildet sind, mit erstaunlichen Wirkungen - man denke nur an die vielen Analgetica - und begann so Arneimittel zu konstruieren. Das war der Anfang der Chemotherapie. Ein riesiger Aufschwung dieser synthetisch hergestellten, gegen viele Krankheitserscheinungen spezifischen Mittel griff Platz.

Im Lauf der letzten Jahrzehnte jedoch ging die Entwicklung der Therapie und medizinischen Wissenschaft wieder mehr nach der biologischen Seite. Man musste vielfach erkennen, dass die Gesamtwirkung einer Droge einem daraus hergestellten Reinprinzip überlegen war und dass Inhaltsbestandteile, die man als überflüssige Ballaststoffe beseitigt hatte, für die Allgemeinwirkung sehr erheblich in Frage kommen können. So verlor die isolierte Reinsubstanz allmählich wieder an Bedeutung gegenüber der Droge und den daraus hergestellten Zubereitungen. Diese Entwicklung ist noch keineswegs abgeschlossen und so bemüht man sich, viele alte Arzneipflanzen wieder für die Therapie in Verwendung zu nehmen.

Es ist Aufgabe der Pharmakognosie, durch chemische, pharmakognostische und pharmazeutische Untersuchungen zu prüfen, ob für diese neuerdings wieder vorgeschlagenen Heilpflanzen die Voraussetzungen zu einer Einreihung in den Arzneischatz gegeben sind. Im Rahmen dieser Bestrebungen sind am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München einige alte Arzneipflanzen untersucht worden, zum Teil finden sie noch Untersuchung, so das Schöllkraut und die Blutwurz, der Bärlauch und das Löffelkraut, die Artischoke und der Bergrhabarber. Die vorliegende Arbeit verfolgt den Zweck, die Früchte der Mariendistel nach allen Richtungen mit Ausnahme der physiologischen Prüfung zu untersuchen. Bisher liegen nur spärliche Angaben über die Inhaltsstoffe von Carduus marianus vor, auf die in der Arbeit jeweils an geeigneter Stelle hingewiesen wird.

Ausführung.

I. Pharmakognostisch-botanische Untersuchung.

Carduus marianus ist eine einjährig überwinternde oder zweijährige, zu der Familie der Compositen zählende Pflanze. Sie erreicht eine Höhe von 60-150 cm und besitzt eine spindelförmige Wurzel; der Stengel ist aufrecht gewachsen, an der Spitze meist verästelt, und diese Äste tragen die 4-5 cm langen aufrechten oder etwas nickenden Blütenköpfe. Diese bestehen aus schönen purpurroten Blüten, die Zeit der Blüte ist von Juni bis September.

Die Blätter sind groß (ca.30 cm lang), elliptisch und buchtig gelappt. An den Enden der Lappen befinden sich kräftige gelbe Dornen. Die Farbe der Blätter ist glänzend grün, entlang den Blattnerven verlaufen jedoch weiße Flecken, welche für Carduus marianus charakteristisch sind und vor allem als Unterscheidungsmerkmal von Carduus benedictus dienen.

Aus dem Blütenstand entstehen nach der Befruchtung die Früchte, hartschalige Achänen, welche mit einem seidigen weißen Pappus versehen sind. Dieser ist bei der Droge beseitigt, und nur noch eine kleine, knapp millimeterhohe kegelige Vorwölbung, welche dem gelblichen, urnenförmigen Fruchtrand aufsitzt, erinnert daran, dass hier der Pappus eingefügt war. Die Früchte sind 6-8 mm lang, ca. 3 mm breit und 1.5 mm dick. Sie sind oval und gegen das eine Ende zu abgeflacht. Die Schale ist entweder glatt und glänzend und dann einfarbig braunschwarz oder aber graubraun und von einer matten Aussenhaut umgeben. Reibt man eine graubraune Frucht mit dem Fingernagel, so zeigt sich auch hier eine glänzende, schwärzlichlängsgestreifte Schale, die allerdings etwas heller ist. Diese Unterschiede haben mit Reife nichts zu tun, da die Zahl der grauen Früchte mit zunehmender Reifung nicht abnimmt.

Es muss bei dieser Gelegenheit darauf hingewiesen werden, dass in fast allen Lehrbüchern von Mariendistel- S a m e n berichtet wird. Es handelt sich dabei ausgesprochen um eine Frucht, wie sie den Compositen eigen ist. Die Fruchtschale umschließt den Samen mit den beiden Keimblättern.

Carduus marianus gilt als südliche Pflanze. Ihre ursprüngliche Heimat sind die vorderasiatischen Steppen, wo sie heute noch ganze „Distelwälder" bildet. Von da verbreitete sie sich allmählich über das ganze Mittelmeergebiet. Im allgemeinen werden sonnige, felsige Hänge von ihr bevorzugt. Nach Deutschland dürfte die Droge schon im frühen Mittelalter gekommen sein, wohl mit der Kultur der Klöster. Sie wurde damals viel kultiviert, während sie heute nur noch vereinzelt zu finden ist, so vor allem im Gebiet der Steppenheide.

Die Mariendistel lässt sich jedoch auch bei uns gut anpflanzen. Dies beweisen vor allem Anbauversuche, die zur Zeit in Eichenau bei Fürstenfeldbruck durchgeführt werden. Die Pflanze stellt hinsichtlich des Bodens wenig Ansprüche und gedeiht auf dem dortigen Niederungsmoor, welches auf Kies aufliegt, sehr gut. Die Tiefe der Humusschicht schwankt in Eichenau zwischen 0.80 und 0.15 m. Für die Mariendistel werden die Flächen geringster Humusstärke gewählt. Durch Pflugarbeit werden sie noch kräftig mit Untergrundkies durchsetzt. Die Böden sind als trockene humose Kiesböden anzusprechen, wenn auch der Grundwasserstand gelegentlich hoch ist.

In Eichenau werden jährlich auf einer Anbaufläche für Mariendistel von 0.1 ha etwa 50 kg geerntet, womit hauptsächlich Münchener Großfirmen beliefert werden. Nach Angaben des Statistischen Reichsamtes Berlin betrug die Anbaufläche in Deutschland im Jahre 1936 insgesamt nur 0.7 ha. Dabei liegt ein Jahresbedarf an dieser Droge von mindestens 6500 kg vor,

wie aus der Drogenliste der Reichsarbeitsgemeinschaft für Heilpflanzenkunde und Heilpflanzenbeschaffung hervorgeht. Es müssen demnach noch recht erhebliche Mengen eingeführt werden, als Hauptlieferant kommt Italien in Betracht. Durch Steigerung des Anbaus könnte auch hier im Rahmen des Vierjahresplans wertvolle Arbeit geleistet werden.

Die Früchte werden arzneilich verwendet, wobei zwei Qualitäten unterschieden werden, graue und schwarze Früchte. Es soll sehr schwer sein, bei der Ernte nur rein schwarze, glatte Früchte zu erhalten, die im allgemeinen von den Käufern, wahrscheinlich wegen des besseren Aussehens, bevorzugt werden. Wie aus der Apothekenpraxis bekannt ist, sollen die grauen Früchte eine vollkommen klare Tinktur ergeben, während Tinkturen aus schwarzen Früchten mit der Zeit Trübungen aufweisen. Worauf dies zurückzuführen ist, wurde bisher nicht festgestellt, jedenfalls sind die grauen Früchte hinsichtlich der wirksamen Inhaltsstoffe als gleichwertig anzusehen, auch konnte in keinem der neuen homöopathischen Arzneibücher eine Forderung nach nur glatter, schwarzer Ware gefunden werden. Die Früchte stellen übrigens, wahrscheinlich wegen ihres Fettgehaltes, für Vögel ein willkommenes Futter dar, sodass die Anpflanzungen sorgsam geschützt werden müssen. Wie berichtet wird (1), werden die Blütenköpfe mit den reifen Früchten aus diesem Grund in Steiermark als Lockmittel beim Vogelfang verwendet.

Da es eine Aufgabe der Pharmakognosie ist, eine arzneilich verwertbare Droge nach allen Richtungen hin mit Ausnahme der physiologischen Wirkung wissenschaftlich zu untersuchen und unter allgemeinen Gesichtspunkten miteinander zu verknüpfen, wird zunächst an Hand durchgeführter mikroskopischer Untersuchungen eine pharmakognostische Beschreibung der Frucht von Carduus marianus gegeben.

---

1) G.Hegi, Illustrierte Flora von Mitteleuropa. Bd.6, 2, S.919. München 1929.

Zur Veranschaulichung der anatomischen Verhältnisse des Perikarps und der Samenschale wurden Querschnitte gemacht, die eine sehr vielgestaltige anatomische Struktur aufweisen.

Das Perikarp besteht zunächst aus einer epidermalen Zellschicht, die von farblosen, radial langgestreckten Palisadenzellen gebildet wird, deren tangentiale Aussenwand sehr stark und die Seitenwände bis zu einem Drittel ihrer Längserstreckung etwas weniger stark verdickt sind, wodurch das Bild einer hufeisen- oder U-förmigen Verdickung dieser Zellen entsteht. Auf die Epidermis folgt eine Schicht zarter schmaler Zellen mit im Chloralhydratpräparat und vor allem bei Zugabe von Salzsäure weinrot gefärbten Pigmentkörnchen. An die Pigmentschicht schließt sich ein mehrschichtiges Parenchym mit vereinzelten Gefäßbündeln und die innere Epidermis des Perikarps aus kleinen gelblichen Zellen an. Diese drei Schichten der Frucht - äussere Epidermis, Pigment- und Parenchymschicht und innere Epidermis - dürften aus dem Exo-, Meso- und Endokarp des Perikarps hervorgegangen sein.

Auf die Frucht folgt nun unmittelbar, da es sich um eine Achäne handelt, wo bekanntlich Frucht und Samen eine Einheit bilden, die äusserste Schicht der Samenschale, die aus sehr langen, englumigen, radial palisadenartig angeordneten, verholzten, auffallend zitronengelb gefärbten Sklerenchymzellen besteht. Der Rest der Samenschale setzt sich aus kleinen blassbräunlichen Zellen zusammen, die meist sehr stark kollabiert sind. Diese einzelnen Schichten des Perikarps und der Samenschale umschließen das Gewebe des Keimlings und der Kotyledonen, das mit fettem Öl und großen Aleuronkörnern angefüllt ist; vereinzelt treten auch kleine Oxalatdrusen auf.

Für das Pulver bilden die einzelnen Zellschichten in ihrer verschiedenartigen anatomischen Struktur sehr charakteristische Merkmale, wie zum Beispiel

Bruchstücke der U-förmig verdickten Epidermiszellen oder der rot gefärbten Pigmentschicht des Perikarps und die sehr häufig anzutreffenden zitronengelben, langgestreckten Sklerenchymzellen der Samenschale.

Eine ausführliche pharmakognostische Bearbeitung der Anatomie und Beschreibung der Pulverkennzeichen findet zur Zeit im Rahmen einer Dissertation im Institut für pharmazeutische Arzneimittellehre (Pharmakognostische Anstalt) der Universität München statt.

II. Chemische Aufarbeitung.

A. Voruntersuchungen.

Wie schon in der Einleitung kurz angeführt, liegen wenig genaue Angaben über die Inhaltsstoffe von Carduus marianus vor, wenigstens soweit sie für eine therapeutische Wirkung in Frage kommen können. Beschrieben wird in der Literatur von W i t t s t e i n (1) fettes Öl, Gerbstoff und Bitterstoff, die nicht näher untersucht sein sollen. Diss deckt sich mit den Angaben von W e h m e r (2), T h o m s (3) und A s s m a n n (4), wobei anzunehmen ist, dass diese Autoren, deren Veröffentlichungen zu einem späteren Zeitpunkt erfolgten, die Angaben von W i t t s t e i n einfach übernommen haben. Einigermaßen bedeutsamer erscheinen die Angaben von U l l m a n n (5), 1922, der das Vorkommen von Tyramin in recht erheblichen Mengen in Mariendistelfrüchten beschreibt. Ausgedehntere experimentelle

---

1) Wittstein, Handwörterbuch der Pharmakognosie, S.521 (1882).
2) Wehmer, Die Pflanzenstoffe, S.1255 (1931).
3) Thoms, Handbuch der Pharmazie. Bd.V, S.1689 (1931).
4) Assmann, Ztschr.f.Hom. 3, 60 (1929).
5) Ullmann, Biochem.Ztschr. 128, 402 (1922).

Untersuchungen liegen nicht vor, so dass es notwendig war, die Früchte von Carduus marianus einer erschöpfenden Untersuchung auf eine große Zahl von Verbindungen, denen allenfalls eine physiologische Wirkung zukommt, zu unterziehen.

Die für die vorliegende Arbeit verwendete Droge wurde teils aus dem Handel, teils vom Anbauer selbst aus der Gegend von Eichenau bei München bezogen +). Sie wurde vor der chemischen Aufarbeitung grob gepulvert. Da die Früchte einen hohen Fettgehalt aufwiesen, der namentlich bei wässrigen Auszügen durch Emulsionsbildung störend wirken konnte, ausserdem bei der Aufbewahrung der fetthaltigen Droge die Gefahr der Zersetzung wichtiger Stoffe durch Ranzigwerden der Fette bestand, kam fast ausschließlich im Soxhlet mit Petroläther vollständig entfettete Droge zur Anwendung. Wenn nicht entfettete Droge verwendet wurde, so wurde dies besonders angeführt.

1) Qualitative Vorprüfung.

Um überhaupt einen Überblick über die Inhaltsstoffe der Früchte zu gewinnen, die bei der Herstellung eines Extrakts ausgezogen werden, wurden zunächst einige Vorproben angestellt. Zu diesem Zweck wurden je 10 g Drogé mit 50 ccm Wasser und ebenso mit 50 ccm 1-proz. Salzsäure 1/4 Stunde lang auf dem Wasserbad erhitzt und nach dem Erkalten filtriert.

a) Prüfung des wässerigen Auszugs.

1) Schwach saure Reaktion.
2) Zugabe einiger Tropfen verdünnter Eisenchloridlösung: Auftreten einer Trübung, die nach einigen Minuten schmutzig-bläuliche Färbung annahm (Hinweis auf Gerbstoff).

+) Ich möchte nicht versäumen, an dieser Stelle Herrn Amtsrat a.D. Adolf Pfaffinger, Heilpflanzenanbau Eichenau, für das freundliche Interesse, das er meiner Arbeit entgegengebracht hat, und für die wertvollen Ratschläge bestens zu danken.

3) Zugabe von 20-proz. Bleiacetatlösung: grünlichweiße Fällung (Hinweis auf Pflanzensäuren, Gerbstoff, Schleim, Eiweiß).
4) Zugabe einiger Tropfen Fehling'scher Lösung: zunächst Grünfärbung, dann allmähliche Ausscheidung von rotem Kupferoxydul. Nach 4-tägiger Mazeration der Droge mit Wasser im Kälteschrank erfolgte sofortige starke Reduktion. Wurde die Droge mit 10-proz.Salzsäure gekocht, neutralisiert und mit Fehling gekocht, so wurde ebenfalls reduziert (Hinweis auf reduzierende Substanzen und Spaltprodukte).
5) Zugabe gleicher Teile Alkohol: Ausfällung (Eiweiß, Schleim).
6) Zugabe von Kalilauge und einiger Tropfen stark verdünnter Kupfersulfatlösung: Violettfärbung (Biuret).
7) Zugabe von Millons Reagenz: Rosafärbung (Tyrosin).
8) Zugabe einiger Tropfen 20-proz. α-Naphtollösung und Unterschichten mit konz.Schwefelsäure: Violettfärbung (Kohlehydrate, Glykoside).

b) Prüfung des salzsauren Auszugs.

1)	Zugabe von	Mayers Reagenz	Fällung
2)	"	" Dragendorffs Reagenz ...	Fällung
3)	"	" 10-proz. Tanninlösung ..	Fällung
4)	"	" Jod-Jodkalilösung	Fällung
5)	"	" Phosphorwolframsäure ...	Fällung
6)	"	" Esbachs Reagenz	Fällung

Im allgemeinen wird der positive Ausfall dieser Reaktionen als ein Hinweis auf Alkaloide gedeutet. Die Reaktionen sind jedoch unspezifisch und können auch durch Eiweiß, Glykoside, Gerbstoffe und Schleime hervorgerufen werden.

7) 10 ccm der salzsauren Lösung wurden mit Äther dreimal ausgeschüttelt und die ätherische Lö-

sung auf eisenchloridhaltige konz.Schwefelsäure (1:100) geschichtet. Dabei entstand ein intensiv blauer Ring, welcher allmählich ins Grüne übergin Die oben schon genannten Alkaloidreaktionen waren nach dem Ausschütteln weiterhin positiv, sodass d die Reaktion auslösende Stoff nicht mit den Alkal idfällungen in Zusammenhang stehen konnte. Die Farbreaktion wurde aus neutraler oder alkalischer Drogenlösung nicht erhalten. Wurde jedoch z.B. n trale Lösung mit 10-proz. Salzsäure versetzt und der entstehende Niederschlag abfiltriert, so gab das Filtrat, mit Äther extrahiert, die Probe eben falls positiv. Im weiteren Verlauf der Untersuch gen wurde dieser Ring auch mit einer Probe einer erschöpfenden Extraktion mit abs. Äther, sowie ei Auszuges mit Amylalkohol erhalten. Es handelte sich demnach um einen Stoff, der in Äther und Amy alkohol löslich war und durch Salzsäure in Freihei gesetzt wurde.

Schüttelprobe.

5 g entfettete Droge wurden mit Wasser, dem etw Soda zugesetzt war, geschüttelt. Es ergab sich ei kräftiger, einige Zeit bestehen bleibender Schüttelschaum (Saponine).

c) Extraktion mit neutralen Lösungsmitteln [1].

Neben den hier beschriebenen Extraktionsproben wur de noch ein Arbeitsgang unter Verwendung neutraler Lö sungsmittel durchgeführt. Zuerst wurde entfettet. 250 g grobgepulverte Droge kamen 15 Stunden in einem Soxhlet-Apparat mit getrocknetem Petroläther zur Extraktion. Es hinterblieb eine gelbe Petrolätherlösung, welche filtriert und vom Petroläther befreit wurde. Der Rückstand betrug 64.5 g und stellte ein gelbes Öl dar, dessen Geruch an Leinöl erinnerte. Der Ölgehalt entsprach 25.8 %. Es bestand die Möglichkeit, dass Alkaloide oder Glykoside mit ausgezogen waren. Um dies zu prüfen, wurde wieder etwas Petrol-

1) Klein, Handbuch der Pflanzenanalyse, Bd.1.

äther zugegeben und dreimal mit 1-proz.Salzsäure ausgeschüttelt. Die wässerige Schicht wurde abgetrennt und mit 10-proz.Natriumcarbonatlösung alkalisiert und sodann wieder mit Petroläther ausgeschüttelt. Nach dem Abdampfen des Petroläthers wurde mit Wasser aufgenommen. Die wässerige Lösung ergab mit Mayers Reagenz keine Ausfällung, sie war also frei von Alkaloiden.

Die restlichen 185.5 g Droge wurden 15 Stunden im Soxhlet mit abs. Äther extrahiert. Dabei wurden 4.5 g herausgelöst, was einem Gehalt von 2.43 % entspricht. Der Rückstand zeigte widerlich erstickenden Geruch, die Stickstoffprobe von Lassaigne war negativ.

Als nächstes Extraktionsmittel wurde Chloroform verwendet, 15 Stunden im Soxhlet, und dabei ein gelbes Extrakt erhalten, das nach Abdestillieren des Chloroforms einen gelben, harzigen Rückstand von 8.5 g ergab. Extraktgehalt 4.7 %. Die α-Naphtolreaktion war positiv, die Stickstoffprobe negativ.

Sodann wurde mit abs. Alkohol 1/2 Stunde am Rückflusskühler gekocht. Man erhielt eine gelbe Lösung. Als Rückstand, nach dem Abdampfen des Alkohols, blieben 4.0 g = 2.32 %. Die α-Naphtolreaktion war positiv. Der Rückstand wurde in Alkohol gelöst und i.V. eingeengt, bis sich Abscheidungen ergaben. Dann wurde rasch filtriert und Äther im Überschuss zugegeben, worauf eine amorphe, weiße Fällung entstand, welche sich nach Abfiltrieren an der Luft braun färbte. Eine filtrierte Anschüttelung dieses Stoffes mit etwas Wasser ergab keine Reaktion mit Mayers Reagenz, Gerbsäure- und Bleiacetatlösung. Mit Kalilauge erfolgte Auflösung, auf Zusatz von Salzsäure wieder Fällung.

Die restlichen 168.5 g Droge wurden 1/2 Stunde mit 70-proz. Alkohol am Rückflusskühler gekocht. Man erhielt ein dunkelbraunes, bitter schmeckendes Fil-

trat. Im Rückstand war die α-Naphtolreaktion und die Stickstoffprobe positiv.

Der von Alkohol befreite Rückstand wurde über Nacht mit 400 g kaltem, mit Chloroform gesättigtem Wasser stehen gelassen. Das Filtrat war stark getrübt, reagierte schwach sauer und zeigte beim Erhitzen keine Ausflockung. Mit dem gleichen Volumen Weingeist versetzt, ergab sich eine Fällung, die abfiltriert wurde und sich in Säuren und Alkalien löste

Dann wurde 1/2 Stunde mit 400 g heißem Wasser gekocht. Man erhielt ein schmutzig-graues, bitter schmeckendes Filtrat. Dieses klärte sich nach Zusatz von Kalilauge unter Gelbfärbung. Auf Salzsäurezusatz schlug diese Farbe in rosarot um und es erfolgte wieder starke Trübung.

d) Wasserdampfdestillation.

100 g gepulverte, fetthaltige Droge wurden 3 Stunden der Wasserdampfdestillation unterworfen, wobei ca. 1500 ccm Destillat übergingen. Während anfangs nur Wasser überging, zeigten sich im Laufe der Destillation wachsartige Abscheidungen im Kühler; diese wurden durch zeitweises Abstellen der Kühlung in das Destillat übergespült. Das Destillat selbst war schwach trübe und von süßlich aromatischem Geruch, bei der Durchsicht waren deutliche Flocken zu erkennen. Diese ließen sich mit Äther im Scheidetrichter ausschütteln, worauf Klärung eintrat. Nach Abdunsten des Äthers hinterblieb ein öliger (Fettfleck), leicht flüchtiger, charakteristisch aromatisch riechender Rückstand, der später noch beschrieben wird.

Zusammenfassung.

Diese Vorproben ergaben Hinweise auf eine ganze Reihe therapeutisch wichtiger Inhaltstoffe. Es konnten Alkaloide in der Pflanze enthalten sein, ebenso Glykoside, Saponine und Gerbstoffe. Ausserdem gab ein

bitterschmeckendes Alkoholextrakt die Stickstoffprobe positiv, was wiederum auf ein Alkaloid hindeutete. Andererseits war auch das Vorhandensein eines Bitterstoffs nicht ausgeschlossen. Die Schüttelprobe ließ auf Saponin schließen. Bei der Wasserdampfdestillation hatte sich ein ätherisches Öl ergeben. Der positive Ausfall der beschriebenen Reaktionen machte eine genaue Untersuchung auf diese Stoffgruppen notwendig; denn die Reagentien sind zu einem großen Teil viel zu wenig spezifisch. Es mussten größere Mengen aufgearbeitet und nach Möglichkeit störende Beimengungen ausgeschaltet werden.

2) Quantitative Prüfung und Bestimmung von Kennzahlen.

Bevor nun die Droge einem Analysengang auf Inhaltstoffe unbekannter Art in größeren und quantitativen Versuchen zugeführt wurde, erfolgte die Charakterisierung der Droge nach allgemeinen Gesichtspunkten. Berücksichtigt wurde dabei Wassergehalt, Asche, Fett, Eiweiß und Rohfaser.

Wassergehaltsbestimmung.

Der Wassergehalt einer Droge ist großen Schwankungen unterworfen. Er ist abhängig von der Trocknung der Droge nach der Ernte und den Lagerungsbedingungen. Es kam von Eichenau frisch bezogene Ganzdroge zur Untersuchung. Diese wurde in einem Mörser grob gepulvert und je 5 g in einem Wägeglas genau abgewogen. Sodann wurde im Trockenschrank bei 105° solange getrocknet, bis Gewichtskonstanz eingetreten war. Es ergab sich ein Mittelwert von 7.4 % bei 105° flüchtigen Bestandteilen.

Einwaage:	I. 5.0242 g;	II. 5.0136 g	
Verlust durch Trocknen:	I.	0.3696 g =	7.4 %
	II.	0.3676 g =	7.3 %

Zur Kontrolle kam eine Wassergehaltsbestimmung

nach P r i t z k e r (1) mit der dort beschriebenen Apparatur zur Durchführung. Dabei wurde das vorhandene Wasser mit Perchloräthylen übergetrieben und konnte an einer Skala direkt in ccm abgelesen werden. Aus 25 g gepulverter Droge wurden 1.9 ccm erhalten, was einem Wassergehalt von 7.6 % entsprach. Dieses Ergebnis konnte für praktische Zwecke als genügend übereinstimmend mit der gravimetrischen Bestimmung betrachtet werden. Es handelte sich bei den bei 105° flüchtigen Bestandteilen im wesentlichen nur um Wasser.

Bestimmung des Aschegehaltes.

Zwei Methoden wurden durchgeführt: Nach der ersten wurden 4 g lufttrockene Droge genau gewogen und im Porzellantiegel bis zur Gewichtskonstanz verascht. Nach der Methode des Deutschen Arzneibuchs (2) wurden ca. 1.5 g Droge mit Quarzsand vermischt, im schräg gestellten Porzellantiegel erhitzt und nach einiger Zeit 5-10 Tropfen rauchende Salpetersäure zugegeben und zur vollständigen Veraschung weiter geglüht.

	1.Methode (ohne Sand)	2.Methode (DAB.VI) (mit Sand)
Einwaage	4.3012 g	1.5314 g
Asche	0.1732 g	0.0616 g
Asche in %	4.03	4.02

Fettes Öl.

Bestimmung: Im Verlauf der Aufarbeitung der Droge wurden öfters auch kleinere Mengen im Soxhlet mit Petroläther entfettet. Es fand dabei praktisch eine Erschöpfung statt, allerdings wurde der Wassergehalt des Materials nicht berücksichtigt und jeweils lufttrockene Droge verwendet. In Tabelle 1 sind diese Resultate zusammengestellt, es ergab sich ein Durch-

1) Ztschr.Unters.d.Lebensm. 57, 520 (1929).
Apparatur der Firma Bender u. Hobein, München.
2) DAB.VI 1929. Allgemeine Bestimmungen, S.XLVI.

schnitt von 24.8 %. Der Petroläther wurde nach Filtration jeweils im Vakuum abdestilliert.

Tabelle 1.

Fettgehalt von Fructus Cardui Mariae. Verwendet wurde fetthaltige Droge.

Nummer der Probe	Menge der Droge g	Dauer der Entfettung Stdn.	Fett in g	Fett in %	
1	250.0	15	64.5	25.8	24.8
2	308.3	8	75.4	24.5	
3	99.8	8	24.8	24.9	
4	566.2	24	135.7	24.0	
5	242.5	12	59.5	24.6	
6	206.0	12	51.0	24.7	

Zur Ergänzung wurde auch die Bestimmung fetten Öles einer bei 100° getrockneten Droge unter 40-stündiger Extraktion im Soxhlet durchgeführt. Das Öl wurde nach Abdampfen des Petroläthers im Vakuum genau gewogen.

Hülse + Droge:	50.5000 g	Kölbchen + Öl:	82.3340 g
Hülse leer:	5.6614 g	Kölbchen leer:	70.7292 g
Droge:	44.8386 g	Öl:	11.6048 g

Aus diesen Zahlen errechnet sich ein Wert von 26 %.

Kennzahlen des fetten Öles. Das nach der Petrolätherbehandlung zurückbleibende fette Öl war hellgelb gefärbt und wies einen charakteristischen Geruch auf. Bei längerer Aufbewahrung konnte an den Stöpseln der Flaschen Verharzung festgestellt werden. Das Deutsche Arzneibuch lässt bei den Ölen als wesentliche Kennzahlen Säure-, Verseifungs- und Jodzahl feststellen. Entsprechende Bestimmungen wurden auch bei dem fetten Öl der Mariendistelfrüchte durchgeführt. Die Jodzahl wurde nach der Methode von W i n k l e r ermittelt und dabei ein Wert von 145, als Verseifungszahl ein Wert von 188 und als Säurezahl ein solcher

von 16.4 erhalten. Diese Kennzahlen weisen Ähnlichkeit mit denen des Mohnöls auf, für das eine Jodzahl von 130-150, eine Verseifungszahl von 186-189 und eine Säurezahl von 13.05 angegeben werden (1). Mariendistelöl kann also unter die halbtrocknenden Öle gerechnet werden.

Eiweißbestimmung.

Die Bestimmung des Eiweißgehaltes kann auf verschiedene Weise durchgeführt werden. Hier wurde durch Kjeldahl-Bestimmungen die Menge des vorhandenen Stickstoffs ermittelt und daraus durch Multiplikation mit dem in der Literatur festgelegten Faktor von 6.25 der Eiweißgehalt errechnet.

Die Durchführung geschah folgendermaßen: Je 2 g grob gepulverte Droge wurden in einem Kjeldahl-Kolben unter Zugabe von Selen und Paraffin als Katalysatoren mit konz. Schwefelsäure zerstört und das aus der stickstoffhaltigen Substanz entstandene Ammonsulfat mit Natronlauge im Überschuss versetzt. Der entstehende Ammoniak wurde mit n/1-Salzsäure gebunden und die überschüssige Säure mit n/1-Natronlauge bestimmt.

Versuchsergebnisse:	I	II	III
Einwaage in g	2.0714	2.0278	2.0252
Verbrauch an n/1-Natronlauge in ccm	3.92	4.00	3.90
Stickstoff in %	2.65	2.76	2.70
Eiweiß (Faktor 6.25) in %	16.56	17.25	16.88

Als Mittelwert aus den drei Bestimmungen ergab sich ein Eiweißgehalt von 16.9 %.

Rohfaserbestimmung.

Unter Rohfaser versteht man den bei einer bestimmten Behandlung mit verdünnten Säuren und Alkalien ver

1) Deutsche Apoth.Ztg. 39, 269 (1919).

bleibenden Rückstand. Es kann sich dabei nicht um die Bestimmung eines einheitlichen Stoffes, etwa nur der Zellulose handeln, sondern es wird ganz allgemein der weniger leicht lösliche Anteil der Zellmembran ermittelt, während Eiweißkörper, Fette und Kohlehydrate, ebenso Gerbstoffe und Bitterstoffe in Lösung gebracht werden. Es gilt also auf der einen Seite eine möglichst vollständige Hydrolyse dieser Stoffe herbeizuführen, andererseits dürfen die Gerüstsubstanzen selbst durch die angewandten Säuren nicht angegriffen werden.

Von den verschiedenen für diese Bestimmung gebräuchlichen Methoden fand zunächst die von S c h a r r e r und K ü r s c h n e r (1) Anwendung, welche in einer sauren Hydrolyse besteht. 3.0 g gepulverte und entfettete Droge wurden mit 75 ccm 70-proz. Essigsäure, 5 ccm konz. Salpetersäure und 2 ccm Trichloressigsäure 1/2 Stunde lang am Rückflusskühler gekocht. Sodann wurde mit Wasser auf 100 ccm verdünnt und durch ein quantitatives Filter filtriert. Der Rückstand wurde solange mit heißem Wasser ausgewaschen, bis das Filtrat nicht mehr sauer reagierte. Alsdann wurde bei 105° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (Rohfaser + Asche). Der getrocknete Rückstand kam in einem gewogenen Tiegel zur Veraschung. Der Rohfasergehalt konnte durch folgende Formel errechnet werden:

$$\% \text{ Rohfaser} = \frac{[(\text{Rohfaser} + \text{Asche}) - \text{Asche}] \cdot 100}{\text{Einwaage}}$$

Zwei Bestimmungen wurden durchgeführt. Um Zufälligkeiten und Fehlermöglichkeiten zu vermeiden, fand entfettete Droge Anwendung.

Versuchsergebnisse:

Einwaage (Ausgangsmaterial) in g	3.0802	2.9856
Faser + Asche in g	1.0312	0.9402
Asche in g	0.0050	0.0030
Rohfaser in % (entfettete Droge)	33.3	31.4
Rohfaser in % (fetthaltige Droge mit 26 % Fett)	24.64	23.34

1) Ztschr.f.Fütterungslehre 3, 302 (1932).

Da die Verfahren zur Rohfaserbestimmung nur Konventionsmethoden darstellen, erschien es zweckmäßig, zur Ermittlung sicherer Werte mindestens zwei Bestimmungsverfahren anzuwenden. Deshalb wurde im Anschluß an das Verfahren von S c h a r r e r und K ü r s c h n e r auch das von H e n n e b e r g und S t o h m a n n (1) herangezogen, das als „Weenderverfahren" bekannt ist. Hier wird durch eine an die saure Hydrolyse sich anschließende Behandlung mit Kalilauge eine vollständige Hydrolyse, vor allem der Proteinstoffe gewährleistet. Zum Vergleich wurden je 3 g fetthaltige und entfettete Droge aufgearbeitet.

3 g der gepulverten lufttrockenen Droge wurden mit 200 ccm 1.25-proz.Schwefelsäure 30 Min. in einem 500 ccm-Erlenmeyer auf einer dicken Asbestplatte am Rückflusskühler im Sieden erhalten. Nach kurzem Erhitzen wurde heiß filtriert, nicht - wie angegeben - durch einen Glasfiltertiegel, sondern durch einen Hirsch-trichter, dem 0.5 g feinfaseriger Goochtiegelasbest aufgelegt wurde. Der so erhaltene Rückstand samt Asbest wurde mit 1.25-proz. Kalilauge in den Erlenmeyer zurückgespritzt, mit dieser Lauge auf 200 ccm aufgefüllt und mit 1 ccm Amylalkohol versetzt und wiederum 30 Min. unter leichtem Sieden vorsichtig wegen des Schäumens der Flüssigkeit gekocht. Sodann wurde wiederum durch 0.5 g Goochtiegelasbest filtriert und mit heißem Wasser, sowie mit Alkohol und Äther ausgewaschen. Die Rohstoffe, sowie der Asbest wurden in eine Platinschale gebracht und bei 105° bis zur Konstanz getrocknet. Alsdann wurde verascht. Ausserdem wurde das Gewicht des Asbests nach Trocknen bei 105° und nach Glühen festgestellt. Zum Vergleich sind die nach S c h a r r e r und K ü r s c h n e r erhaltenen Werte nochmals aufgeführt.

---

1) Handbuch der Lebensmittelchemie, Bd.II, 2, S.940 (1935).

Versuchsergebnisse.

	Scharrer u. Kürschner		Henneberg u. Stohmann	
	entfettet	entfettet	fetthaltig	entfettet
Einwaage (Ausgangsmaterial) in g	3.0802	2.9856	3.0270	3.0306
Faser + Asche bei 105° in g	1.0312	0.9402	0.7284	1.0318
Asche in g	0.0050	0.0030	0.0066	0.0222
Rohfaser in g	1.0262	0 9372	0.7218	1.0096
Rohfaser in % (entfettete Droge)	33.3	31.4	-	33.3
Rohfaser in % (fetthaltige Droge mit 26 % Fett)	24.6	23.2	23.9	24.7

0.5 g Asbest = 0.4966 g (105°) = 0.4312 g (geglüht)

Die nach den beiden Verfahren erzielten Werte zeigten befriedigende Übereinstimmung, so dass als tatsächlich vorhandene Rohfaser das Mittel aller durchgeführten Versuche festgelegt werden kann. Dabei ergab sich ein Rohfasergehalt von 24.1 %.

Restbestandteile.

Aus der Droge wurden bisher Wasser, Asche, Fett, Eiweiß und Rohfaser bestimmt. Bei den experimentell nicht ermittelten Restbestandteilen dürfte es sich vorwiegend um Kohlehydrate handeln. Dabei muss noch bemerkt werden, dass als Eiweißstoffe alle stickstoffhaltigen Verbindungen erfasst wurden und dass auch in den aus der Differenz ermittelten „Kohlehydraten" andere Inhaltstoffe unbekannter Zusammensetzung mitenthalten sein können. Unter dieser Voraussetzung zeigte die Zusammensetzung von Fructus Cardui Mariae folgendes Bild:

Wasser	7.40 %
Asche	4.03 %
Fett	26.00 %
Eiweiß	16.90 %
Kohlehydrate ..	21.57 %
Rohfaser	24.10 %
	100.00 %

B. Hauptuntersuchung. Prüfung auf bestimmte Verbindungsgruppen.

In dem Abschnitt, der sich mit den Vorproben über die Inhaltstoffe von Fructus Cardui Mariae beschäftigte, war zusammenfassend festgestellt worden, dass der Ausfall der Vorproben Möglichkeiten für das Vorkommen der verschiedensten Inhaltstoffe, von Alkaloiden, Glykosiden, ätherischem Öl usw. offenließ. Die zur Verfügung stehenden Vorproben waren nicht spezifisch genug, um eindeutige Schlüsse zu ermöglichen, so dass eine spezielle Untersuchung auf die wichtigsten Verbindungsgruppen mit therapeutischen Wirkungsmöglichkeiten in Angriff genommen werden musste. Die Versuche wurden mit dem Ziel des Nachweises von Alkaloiden, Glykosiden, Saponinen, Gerbstoffen, Bitterstoffen, ätherischem Öl und Eiweißabkömmlingen (biogenen Aminen) durchgeführt.

1) Alkaloide.

Bei der Untersuchung eines 1-proz. salzsauren Auszuges der Droge hatten sämtliche Alkaloidreagentien positive Reaktion ergeben. Es waren Fällungen entstanden. Diese konnten jedoch auch von Eiweißkörpern, Gerbstoffen oder Glykosiden herrühren. Es war daher notwendig, eventuell vorhandene Alkaloide durch geeignete Isolierungsmethoden zu trennen. Mit den so erhaltenen, gereinigten Lösungen wurden nochmals die Alkaloidreaktionen angestellt.

Die Alkaloide sind stickstoffhaltige Pflanzenbasen. Der Stickstoff ist bei ihnen gewöhnlich zyklisch gebunden, sie haben so den Charakter sekundärer oder tertiärer Amine oder quarternärer Ammoniumbasen. Als substituierte Ammoniakderivate reagieren sie basisch. Die Alkaloide kommen nur äusserst selten frei in den Pflanzen vor und neigen auf Grund ihres Basencharakters zur Salzbildung mit den in den Pflanzen vorhandenen organischen Säuren, wie Gerbsäure,

Äpfelsäure, Citronensäure und Oxalsäure. Den Alkaloiden gemeinsam ist ausserdem ihre physiologische Wirkung auf das Zentralnervensystem. Sie zeigen im allgemeinen gutes Kristallisationsvermögen, einige wenige sind flüssig, wie Coniin, Nicotin und Spartein, welche unzersetzt destillieren. Ebenso gelingt auch die Reinigung vieler fester Alkaloide durch Destillation im Hochvakuum. Über die Entstehung der Alkaloide in den Pflanzen neigt man in neuerer Zeit zu der Ansicht, dass sie nicht als Zwischenprodukte der Eiweißbildung anzusehen sind, auch nicht als primäre Zerfallsprodukte sonstiger komplexer stickstoffhaltiger Gewebe, sondern dass es sich um Plasmabausteine handelt, die durch die besonderen synthetischen Fähigkeiten der Pflanze gebildet werden.

Da die Alkaloide gewöhnlich als pflanzensaure Salze vorliegen, so lassen sie sich mit Wasser aus dem pflanzlichen Material herauslösen, ebenso sind die mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel, wie Alkohol und Aceton, dafür geeignet.

Durch Behandeln der Alkaloidsalze mit sogen.Alkalisierungsmitteln, als welche Alkalien, Erdalkalien, Carbonate und Bicarbonate, sowie Ammoniak in Betracht kommen, gelingt eine Spaltung in freies Alkaloid und pflanzensaures Alkali.

Das freie Alkaloid ist dann in den organischen Lösungsmitteln löslich, welche sich mit Wasser gewöhnlich nicht mischen. Starker Alkohol löst sowohl Alkaloidsalze wie auch die freien Alkaloide.

Auf diesen, fast allen Alkaloiden gemeinsamen Lösungsverhältnissen bauen sich die Trennungsverfahren auf. Man hat die Möglichkeit, durch Extraktion mit sauren Lösungsmitteln die Alkaloide als Salze zu isolieren. Dabei bleiben die basischen Verunreinigungen in der Pflanze zurück. Durch Alkalisieren mit Kalilauge können die Alkaloide in Freiheit gesetzt und

mit organischen Lösungsmitteln ausgeschüttelt werden. Nach Abdampfen dieser Lösungsmittel und Aufnahme mit verd. Säuren erhält man mit Alkaloidreagentien die Fällungen. Dieser Trennungsweg wurde bei den Extrakten 1 bis 4 beschritten. Die Ergebnisse sind nachfolgend zusammengestellt.

Andererseits aber kann die Droge selbst alkalisiert werden, wie in Extrakt 6, unter Verwendung von Kalilauge und braucht nur mit neutralem organischem Lösungsmittel ausgezogen zu werden. Dadurch werden saure Verunreinigungen zurückgehalten. Im Extrakt 5 wurde als Alkalisierungsmittel Ammoniak verwendet, da Natronlauge nicht in allen Fällen ein geeignetes Alkalisierungsmittel darstellt.

Die Extrakte wurden mit je 50 g Droge und 500 g Extraktionsmittel hergestellt. Bei den Extrakten 1 bis 5 wurden die Proben 24 Stunden in einem kleinen Perkolator mit dem Extraktionsmittel befeuchtet und die überstehende Flüssigkeit in 48 Stunden durchlaufen gelassen. Bei Extrakt 6 wurde die alkalisierte getrocknete Droge je 6 Stunden im Soxhlet extrahiert. Die Ergebnisse der Extraktprüfung sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Bei den einzelnen Extrakten war noch folgendes bemerkenswert:

Zu Extrakt 3.
Die ätherische Ausschüttelung des alkalisierten Extrakts ergab, auf konz.Schwefelsäure geschichtet, einen smaragdgrünen Ring. Nach dem Abdestillieren des Äthers blieb ein gelbbrauner Rückstand, der widerlich stickenden Geruch aufwies und bitter zusammenziehend schmeckte; er war stickstofffrei; mit konz.Schwefelsäure benetzt, zeigte sich Rotfärbung, die allmählich in braun überging; mit konz.Salzsäure ergab sich Grünfärbung.

Tabelle 2

Prüfungsergebnisse verschiedener Extrakte von Fructus Cardui Mariae mit Alkaloidfällungsreagentien.

Nr.	Extraktionsmittel	Farbe des Extrakts	Farbe des wässerigen Rückstands	Alkalisieren mit KOH	1.Ausschüttelung mit Äther u. Abdestillieren des Äthers	Alkaloidreaktionen	2.Ausschüttelung mit Chloroform und Abdestillieren d.Chloroforms	Alkaloidreaktionen	3.Ausschüttelung mit Aceton und Abdestillieren des Acetons
1	HCl 10 %	leuchtend rot	rot	weiße Flocken	Rückstand + 1-proz. HCl	M +, Dr +[+)] J +, G -	Rückstand + 1-proz. HCl	M -, Dr - G -	kein Rückstand
2	Alkohol 96 % + H_2SO_4 1 %	gelb	rotviolett zähflüssig	dunkelbraune Lösung	gelbbrauner Rückstand + 1-proz. HCl	Dr -, M -, G -	kein Rückstand	-	kein Rückstand, ebenso nicht mit Pentan, Essigester, Toluol
					1-proz. CH_3COOH	M -, Dr -, G-			
3	Alkohol 50 % + H_2SO_4 1 %	rot	rosa milchig	gelbe Lösung	gelber Rückstand + 1-proz. HCl	M -, Dr -. G +	gelber Rückstand + 1-proz. HCl	M -, Dr - G -	-
4	Alkohol 96 %+ CH_3COOH 10 %	gelb	braune Lösung und Öltropfen	starke Fällung	Rückstand unlöslich in 1-proz. HCl 1-proz. CH_3COOH		brauner Rückstand unlöslich in 1-proz. HCl	-	
5	Alkohol 96 % + NH_3 10 %	dunkelbraun	schwarzbraune Schmiere	-	Rückstand unlöslich in 1-proz. HCl	-	braune, aromatisch riechende Flüssigkeit, unlöslich in 1-proz. HCl	-	kein Rückstand
6	Direkte Alkalisierung mit KOH und Extraktion mit Äther, Chloroform, Aceton				gelber, zäher Rückstand unlöslich in 1-proz.HCl, 20-proz.H_2SO_4 1-proz.CH_3COOH	-	dunkelgelber, reichlicher Rückstand,unlöslich in 1-proz.HCl, 20-proz.H_2SO_4, 1-proz. Essigsäure	-	reichlicher gelber, harziger Rückstand, unlöslich in 1-proz. HCl, 20-proz.H_2SO_4, Äther, Chloroform, Benzol, löslich in Alkohol u.Kalilauge

[+)] M = Mayers Reagenz
Dr = Dragendorffs Reagenz
J = Jod-Jodkali
G = Gerbsäure

m
d
n
g
b
n

s
v
s
w
E
v
g

E
l
n
u
d
k
S
p

b

Zu Extrakt 5.
Ein großer Teil der schwarzbraunen Schmiere wurde mit Wasser aufgekocht und vom Ungelösten abfiltriert. Das Filtrat war dunkelbraun, ergab Dragendorff, Gerbsäure, Bleiacetatlösung positiv. Mit 1-proz.Salzsäure und 20-proz.Schwefelsäure entstand eine Fällung, nicht mit Essigsäure. Die Fällung mit 1-proz.Salzsäure ergab die Stickstoffprobe positiv. Das Filtrat gab Dragendorff und Gerbsäure nur noch schwach positiv. Das Ungelöste wurde dann mit 1-proz.Salzsäure erwärmt und filtriert; es erfolgte eine grobe Ausflockung. Diese zeigte die Stickstoffprobe positiv. Das Filtrat gab Dragendorff und Gerbsäure positiv.

Zusammenfassend konnte bei dieser Aufarbeitung der Nachweis eines Alkaloids nicht erbracht werden. Positive Alkaloidreaktionen wurden zwar bei Extrakt 1 erhalten, auch bei Extrakt 3 war die Gerbsäurereaktion positiv. Andererseits zeigten sich beim Alkalisieren mit Kalilauge keine Ausfällungen von in Wasser unlöslichen Alkaloiden. Auch beim Alkalisieren mit Ammoniak, wie in Extrakt 6, konnten aus dem alkalisierten Rückstand mit Äther, Chloroform und Aceton keine alkaloidhaltigen Rückstände erhalten werden. Die beim Alkalisieren von Extrakt 1 auftretende starke Ausflockung löste sich nicht in organischen Lösungsmitteln, sodass die Ausfällung auf Eiweiß schließen ließ, jedenfalls konnte aus dem Äther bei Extrakt 1 nur ein ganz geringer schmieriger Rückstand gewonnen werden. Die Alkaloidreaktionen waren nur schwach positiv. Die positiven Stickstoffproben aus Extrakt 5, welche beim Auskochen der schwarzbraunen Schmiere mit Wasser und 1-proz.Salzsäure entstanden, wiesen auch auf Eiweißstoffe hin. - Die Rückstände nach Abdestillieren der organischen Lösungsmittel waren gewöhnlich nicht in verdünnten Säuren löslich. Dabei war auffallend, dass beim Versetzen

der alkalischen Extrakte mit Säuren sich Ausfällungen ergaben, während umgekehrt bei sauren Extrakten Alkalien keine Fällungen hervorriefen, sondern im Gegenteil getrübte saure Extrakte zur Klärung brachten. Auch diese Tatsache sprach dafür, dass Alkaloide nicht vorhanden sind.

Trotz dieser bisherigen negativen Ergebnisse bezüglich der Anwesenheit von Alkaloiden wurde die Prüfung auf diese Stoffe fortgesetzt, da sie als die wichtigsten Verbindungsgruppen mit physiologischer Wirksamkeit in Betracht kommen. Es war möglich, dass sich geringe Mengen solcher Stoffe durch die Vergesellschaftung mit anderen, in größerer Menge vorkommenden Inhaltsbestandteilen dem Nachweis entziehen konnten. In den folgenden Versuchen wurde deshalb angestrebt durch eine Vorextraktion unter geeigneten Bedingungen hier nicht in Frage kommende Begleitstoffe zu entfernen und vorhandene Alkaloide in der Droge zu fixieren. In gewissem Sinne stellte die Vorextraktion der Droge bei der Entfettung mit Petroläther eine solche Maßnahme dar. Es wurde festgestellt (siehe S.13), dass dabei Alkaloide nicht mit in Lösung gingen. Man kann den Versuch machen, durch Behandlung mit anderen organischen Lösungsmitteln eine weitere Reinigung zu erzielen und dabei durch Zusatz von sauerwirkenden Reagentien zu den Drogen die Bindung der Alkaloide mit der Zellsubstanz zu festigen. Dann gelingt es, die löslichen, nicht basischen Begleitstoffe der Alkaloide mit geeigneten Alkaloidlösungsmitteln vollkommen zu entfernen. Durch Zusatz von alkalisch wirkenden Reagentien kann dann eine Lockerung der Bindung zwischen Alkaloid und unlöslicher Zellsubstanz erreicht und durch nachfolgende Extraktion mit einem Alkaloidlösungsmittel eine von fremden Begleitstoffen reinere Alkaloidlösung erzielt werden. Ein derartiges Verfahren, bei dem sich die Reinigung der Alkaloide also noch in der Droge selbst vollzieht, wurde zum ersten Mal von S t o l l (1) beschrieben und mit Erfolg zur Darstellung des Ergotamins aus Mutterkorn verwendet.

---

1) D.R.P. 357 272.

In Anlehnung an die von S t o l l beschriebene Methode wurde auch bei Carduus marianus verfahren. 200 g gepulverte Droge wurden mit einer Lösung von 20 g Aluminiumsulfat in 30 ccm Wasser, welche als saures Reagenz diente, durchgemischt und getrocknet. Anschließend wurde die Droge fein zerrieben, mit 150 ccm Benzol durchfeuchtet und in einem kleinen Perkolator vorextrahiert. Sodann wurde die Droge in ein großes Becherglas gebracht, 400 ccm Benzol zugegeben und solange trockenes Ammoniakgas eingeleitet, bis die Flüssigkeit lackmusalkalisch reagierte. Nach 3-stündigem Stehen wurde an der Nutsche abgesaugt und mit Benzol nachgewaschen.

2 ccm dieser Benzollösung wurden mit 3 ccm Eisessig versetzt und auf konz. Schwefelsäure geschichtet. Es entstand ein grüner Ring, der im blinden Versuch nicht auftrat.

Beim Unterschichten der Benzollösung mit eisenchloridhaltiger konz. Schwefelsäure zeigte sich ein rotvioletter Ring, dessen obere Zone hellblau war.

Die benzolische Lösung wurde im Vakuum auf 5 ccm eingeengt, wobei sich eine schwach gelbgefärbte, amorphe Masse ausschied. Diese wurde mit 1-proz. Salzsäure ausgekocht und in dem Filtrat auf Alkaloidsalze geprüft. Dragendorffs und Mayers Reagenz, sowie die Gerbsäureprobe waren negativ.

Im Unterschied zu dem Verfahren von S t o l l , welches auf einer vorherigen Abtrennung der störenden Beimengungen beruht, geht eine andere Aufarbeitung darauf hinaus, möglichst alles Störende in der Pflanze zu belassen und nur die Alkaloide oder ihre Salze herauszulösen. So fanden F o r s t und W e e s e (1) Lösungsbedingungen, nach denen es gelang, fettes Öl und dergleichen zurückzuhalten, während die Alkaloide selbst, die sonst vorzugsweise

---

1) Arch.f.exper.Pathol.u.Pharmakol.114, H.3/4, S.129 (1926).

nur in Fettlösungsmittel übergehen, in Lösung gebra
werden konnten. Die Autoren extrahierten zu diesem
Zweck mit Alkohol-Wasser- und Aceton-Wasser-Gemisch

Aus 200 g fetthaltiger Droge wurde mit 400 g Alk
hol-Wasser-Gemisch ein Extrakt hergestellt. Zur
Verwendung kam ein Evakolator nach K e s s l e r (1
welcher den Vorteil hat, dass die Droge durch Evaku-
ieren der Apparatur zur Aufnahme des Lösungsmittels
gewissermaßen aufgeschlossen wird und dass das Lösun
mittel selbst wieder vollständig aus der Droge herau
gezogen werden kann, sodass ein Eindampfen nicht meh
notwendig ist. Man erhielt ein dunkelrotes, bitter
schmeckendes Extrakt von saurer Reaktion. Auf ein
Uhrglas gebracht zeigten sich milchig-harzige Absche
dungen. Eine vom Alkohol befreite Probe wurde mit
Äther ausgeschüttelt und diese Ausschüttelung auf
eisenchloridhaltige konz.Schwefelsäure geschichtet.
Es zeigte sich eine smaragdgrüne Färbung.

Durch vorsichtige Zugabe von 10-proz. Kalilauge
wurde das Evakolat alkalisiert, dabei wurde zunächst
nur lackmusalkalisch und nicht phenolphtaleinalka-
lisch gemacht. Sodann ließ man über Nacht stehen.
Dabei entwich Ammoniak, welches durch angefeuchtetes
Lackmuspapier nachgewiesen werden konnte. Ausserdem
schieden sich feine weiße Nadeln aus, welche abgesau
wurden. Diese waren löslich in Salzsäure, Essigsäur
und Schwefelsäure, unlöslich in Kalilauge und organi-
schen Lösungsmitteln. Mit konz.Schwefelsäure erfolg
keine Schwärzung. Es handelte sich demnach nur um
ausgefallene anorganische Salze oder Hydroxyde. Der
von den Nadeln abgesaugte Niederschlag wurde filtrie
Es hinterblieb eine schwarzgrüne Schmiere. Die
Lassaigne'sche Probe war positiv. Mit verd.Salzsäur
erwärmt, erfolgte Lösung; diese Zeigte Mayer, Dragen-
dorff und Gerbsäure positiv.

---

1) Pharmaz.Ztg.Nr.97, S.1308 (1936).

Das filtrierte Extrakt kam in einen Claisen-Kolben und wurde im Vakuum der Wasserstrahlpumpe vom Alkohol befreit. Dies vollzog sich unter starkem Schäumen. Die schmutzig-grüne, stark getrübte alkalische Lösung wurde 14 Tage in den Eisschrank gestellt. Es erfolgten keine Ausscheidungen. Dagegen schmeckte die Lösung immer noch stark bitter. Auf Zugabe von weiterer Kalilauge wurde eine klare gelbe Lösung erhalten, mit Salzsäure erfolgte Ausflockung. Die abfiltrierten Flocken gaben die Stickstoffprobe positiv, im Filtrat war Dragendorff, Mayer negativ, Gerbsäure positiv.

Bei den vorstehenden Versuchen ließen sich durch neutrale, saure und alkalische Extraktionsmethoden keine Alkaloide ermitteln. Die wenigen positiven Alkaloidreaktionen dürften wohl auf mitextrahierte Eiweißkörper zurückzuführen sein. Auch bei weitestgehender Einschränkung störender Ballaststoffe, wie sie durch eine Vorextraktion nach S t o l l und ebenso durch das Verfahren von F o r s t und W e e s e erzielt werden sollten, konnten Alkaloide in Fructus Cardui Mariae nicht festgestellt werden.

Glykoside.

Unter Glykosiden versteht man ätherartige Kombinationsprodukte von Zuckern mit gewissen organischen Verbindungen, wie Alkoholen und Phenolen. Sie entstehen beim pflanzlichen Stoffwechsel und zwar hat die Pflanze mit diesen Verbindungen die Möglichkeit, labile Stoffwechselprodukte, die sich normalerweise unter biologischen Bedingungen leicht verändern würden, durch Verknüpfung mit einem oder mehreren Zuckern zu stabilisieren. Weiterhin kann die Pflanze Stoffwechselprodukte, die ihr schädlich sind, wie z.B. Phenole, durch Glykosidbildung entgiften. Zu diesen Synthesen stehen den Pflanzen Enzyme zur Verfügung, die andererseits auch wieder spaltend wirken

können, sodass durch das System Glykosid - Enzym ein wichtiger Regulierapparat für Transport und Speicherung in der Pflanze geschaffen ist. Die spaltenden Enzyme sind für die einzelnen Glykoside spezifisch und von der Konfiguration des Zuckerrestes abhängig. Es können so α-Glykoside nur durch α-Glykosidasen gespalten werden. Die in der Natur vorkommenden Glykoside stellen ß-Glykoside dar. Auch mit verdünnten Säuren tritt Spaltung ein.

Man erhält dabei immer eine Zuckerkomponente und das sogen. Aglukon oder Genin. Ausser d-Glukose können auch Mannose, Galaktose, Fructose und Pentosen entstehen. Beim Aglukon handelt es sich gewöhnlich um organische Verbindungen zyklischer Natur, doch können auch anorganische Reste enthalten sein, wie z.B. Kaliumbisulfat beim Senföl.

Nachweismethoden.

a) Molish'sche Probe. Alle Glykoside geben die Molish'sche Probe positiv; sie beruht auf einer Farbreaktion der Zuckerkomponente und gibt mit 20-proz. weingeistiger α-Naphtollösung und ebenso mit 20-proz. Thymollösung beim Unterschichten mit konz. Schwefelsäure Violett- bezw. Rotfärbung.

b) Methode nach Bourquelot. Auf der hydrolysierenden Wirkung der Enzyme hat B o u r q u e l o t (1) ein Verfahren aufgebaut, das auch zur Identifizierung von bisher bekannten Glykosiden herangezogen werden kann durch Bestimmung des sogen. enzymolytischen Reduktionskoeffizienten; dieser steht für jedes Glykosid fest und stellt die Menge Glukose in mg/100 ccm dar, welche bei der Spaltung eines Glykosids einer Drehung von 1° entspricht. Als spaltendes Ferment wird Emulsin verwandt, das Enzymgemisch der bitteren Mandeln, welches für die Spaltung von ß-Glykosiden spezifisch ist. Weiterhin macht sich B o u r q u e l o t die Tatsache zu Nutze, dass alle bisher in de

1) Journ.Pharm.et Chim. 6, 23, 369 (1906).

Pflanzen nachgewiesenen, durch Emulsin spaltbaren Glykoside in wässriger Lösung links drehen und durch einen bestimmten Wert ihrer spezifischen Drehung charakterisiert sind und alkalische Kupferlösung nicht reduzieren. Bei Emulsinspaltungen wird meistens rechtsdrehende d-Glukose gebildet. Dadurch wird die ursprüngliche Drehung nach rechts verschoben und ebenso das Auftreten einer Reduktion bei Zugabe von Fehling'scher Lösung bewirkt. Aus der entstehenden Drehungsänderung kann somit auf die Anwesenheit eines Glykosids geschlossen werden. Bestimmt man nun noch die bei der Spaltung gebildete Glukosemenge, so lässt sich der Reduktionskoeffizient errechnen.

Ausführung. 100 g gepulverte und entfettete Droge wurden in 400 ccm siedenden, 90-proz. Alkohol eingebracht, welcher ca. 5 g Calciumcarbonat enthielt. Durch die Hitze wurden die in der Pflanze enthaltenen Enzyme zerstört, während das Calciumcarbonat die Aufgabe hatte, die hydrolysierende Wirkung vorhandener Säuren auszuschalten. Auf dem siedenden Wasserbad wurde 1/2 Stunde unter Rückfluss erhitzt, wobei eine klare, gelbe Lösung erhalten wurde, welche Fehling'sche Lösung reduzierte. Im Polarisationsapparat war eine Drehung von + 0.6° festzustellen. Kochen einer Probe mit 5-proz. Schwefelsäure führte zu keiner Drehungsänderung. Die Molish'sche Probe war positiv. Sodann wurde filtriert und der Alkohol im Vakuum abdestilliert. Man erhielt eine milchig-harzige, wässrige Aufschwemmung. Sie reduzierte Fehling'sche Lösung. Mit thymolhaltigem Wasser wurde auf 60 ccm verdünnt. 20 ccm dieser Lösung wurden mit 0.2 g Emulsin, weitere 20 ccm mit 20 Tropfen Salzsäure versetzt und zusammen mit 20 ccm Vergleichslösung im Brutschrank 24 Stunden bei einer Temperatur von 30° stehen gelassen. Die stark getrübten Lösungen wurden mit je 4 ccm Bleiessig geklärt und dann polarisiert. Es konnte kein Unterschied im Drehungsvermögen festgestellt werden. In einem blinden Versuch wurde mit einer Salizinlösung die Wirksamkeit des Emulsins bestätigt.

Trotz des negativen Ausfalls dieser Proben erschei das Vorhandensein von glykosidischen Stoffen in Cardu us marianus nicht ausgeschlossen. Beim Einengen des alkoholischen Auszuges entsteht ein reichlicher Niede schlag, welcher der Emulsinwirkung entgeht. Es müss- te sich allerdings um ein nicht wasserlösliches Gly- kosid handeln. Bei der Emulsineinwirkung liegen dann nur so kleine Mengen vor, dass sie sich durch Drehung unterschiede nicht erfassen lassen.

Saponine.

Ihrer chemischen Zusammensetzung nach stellen die Saponine eine Gruppe von Glykosiden dar, die sich durch gemeinsame physikalische Eigenschaften und biologische Wirkungen auszeichnen.

Die Saponine sind in Wasser kolloidal löslich. Ihre Lösungen geben beim Schütteln, ähnlich wie Seife, eine haltbaren Schaum, sie wirken auf Öle emulgierend und erschweren das Absetzen fester Teilchen. Von der intakten Darmwand werden nur sehr geringe Mengen resorbiert, dagegen kann die Resorption anderer Stoffe, z.B. von Arzneimitteln, durch das Vorhandensein von Saponin wesentlich erhöht werden. Da die Saponine mit den Sterinen der Zellwand Verbindungen eingehen, so vermögen sie die roten Blutkörperchen aufzulösen. Diese haemolytische Wirkung wird durch Zusatz von Cholesterin aufgehoben. Als biologische Testobjekte können kleine Fische Verwendung finden, die schon durch ganz geringe Saponinmengen getötet werden.

Zum Nachweis von Saponinen liegen bis jetzt noch keine einwandfreien chemischen und physikalischen Methoden vor. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass die Saponine sehr schwer kristallisieren und sich auf Grund ihres kolloidalen Zustandes von anderen Stoffen nur schwer abtrennen lassen.

Als Hinweis auf Saponine werden in der Literatur folgende Reaktionen angegeben:

a) Sofortige Blaufärbung (1) bei Versetzen eines saponinhaltigen Auszugs mit einem Lösungsgemisch von Ferrichlorid und Ferricyankali.

b) Rot- und Violettfärbung (2) bei Versetzen einer Droge mit konz.Schwefelsäure.

Beide Reaktionen erwiesen sich bei Carduus marianus als negativ. Mit konz.Schwefelsäure erfolgte Gelbfärbung, welche bald in braun und schließlich in schwarz überging.

Als weiterer Nachweis wird das Schaumvermögen der Saponine herangezogen. Auch die Auszüge von Carduus marianus zeigten einen lange bestehen bleibenden Schüttelschaum. Der Schaum konnte aber in gleicher Weise durch andere Inhaltstoffe, z.B. Eiweißstoffe, hervorgerufen werden, sodass diese Methode keinen Anspruch auf Zuverlässigkeit hat; der Saponingehalt ist nicht immer proportional der Schaumzahl.

Der bis jetzt sicherste Nachweis besteht in biologischen Methoden, welche auch zur Wertbestimmung der Saponindrogen herangezogen werden. Beim Fischindex benützt man die Tötung (3) kleiner Fische und Kaulquappen; der sogen. haemolytische Index bezeichnet die Saponinverdünnung, bei der eine 1-proz.Rinderblutaufschwemmung gerade noch haemolysiert wird.

Die haemolysierende Wirkung der Saponine wurde von K o b e r t (4) entdeckt und zu einem quantitativen Verfahren ausgewertet. K o f l e r (5) verbesserte diese Methode weitgehend durch Einführung

---

1) Leupin, Pharm.Act.Helv. Nr.1 (1935).
2) L.Kofler, Die Saponine, S.63 (1927).
3) L.Kofler, Die Saponine, S.118 (1927).
4) Ber.d.Pharm.Ges. 22, 203 (1912).
5) L.Kofler, Arch.d.Pharm. 267, 688 (1929).

der Cholesterinschranke, sowie durch Verwendung von Blutgelatine, wodurch manche Fehlerquelle beseitigt und der Nachweis sehr kleiner Mengen Saponin ermöglicht wurde. Ebenso war die Forderung nach einem bestimmten p_H sowohl bei der Extraktion (1), wie bei der Haemolyse (2), besonders für quantitative Bestimmungen, von großer Wichtigkeit.

Zunächst kam für Carduus marianus eine allgemeine Wertbestimmungsmethode zur Anwendung, weiterhin die Blutgelatinemethode zur Bestimmung kleiner Mengen.

a) Allgemeine Wertbestimmungsmethode (3).

Durch halbstündiges Erwärmen auf dem siedenden Wasserbad wurde mit der fetthaltigen, grob gepulverten Droge (Sieb 5) (4) ein Dekokt von der Konzentration 10.0 : 200.0 hergestellt. Eine höhere Konzentration war deshalb nicht angezeigt, weil andere Extraktivstoffe, wenn sie in größerer Menge vorhanden sind, auch haemolysierend wirken können. Als Extraktionsmittel wurde eine 0.9-proz.Kochsalzlösung verwendet mit n/30-Phosphatpuffergemisch mit einem p_H-Wert von 7.4. Das durch Watte kolierte Dekokt zeigte schwach saure Reaktion, weshalb es mit einigen Tropfen n/1-NaOH auf p_H 7.4 eingestellt wurde (Wulffs Folienkolorimeter). Ausserdem wurde defibriniertes Rinderblut zur Beseitigung des Serums zweimal mit 0.9-proz.Kochsalzlösung und einmal mit Pufferlösung zentrifugiert, wobei die Konzentration des Blutes immer 2 % betragen musste. Daneben wurde eine Digitoninlösung 0.01 : 10 g mit Puffergemisch hergestellt.

---

1) Pharm.Ztg. 82, 1018 (1937)(Ref.). Svend Aage Schou u. Toft Madson, Dansk Tidsskrift f.Farmaci, Nr.6, S.153-164 (1937).
2) L.Kofler u. Lázar, Arch.d.Pharm.265, 623 (1927).
3) L.Kofler, Arch.d.Pharm.265, 624 (1927).
4) L.Kofler u. Adam, Arch.d.Pharm.265, 653 (1927).

In 11 Reagenzgläser von 10 mm lichter Weite wurden nun je 1 ccm der gewaschenen Blutlösung gegeben, dann wechselnde Mengen Pufferlösung von 0.9 ccm an fallend bis 0.1 ccm und jeweils mit Drogenabkochung auf 2 ccm aufgefüllt. In das 11.Reagenzglas kam 1 ccm Digitoninlösung. Nach 12-stündigem Stehen zeigte sich nur in dem die Digitoninlösung enthaltenden Glas Haemolyse, sonst hatten sich die Blutkörperchen abgesetzt, teilweise so stark, dass die rote Farbe verschwunden war, eine Erscheinung, welche auf das Vorhandensein von Gerbstoffen hindeutete, welche agglutinierend wirken. Die Reaktion auf Saponine war also negativ.

b) Blutgelatinemethode (1).

Bei dieser Methode befindet sich das Blut in einer Gelatinelösung von bestimmtem p_H-Wert und die Haemolyse kommt durch das Auftreten eines haemolytischen Hofs schön zur Erscheinung. Ausserdem werden durch Herstellung einer Cholesterinschranke die Saponine als unlösliche Saponin-Cholesteride fixiert, so dass andere Extraktivstoffe, die Einfluss auf das Blut haben, ausgewaschen werden können und somit Täuschungen vermieden werden.

Zunächst wurden, wie oben, Dekokte der fetthaltigen, grob gepulverten Droge mit Pufferlösungen hergestellt, jedoch nicht nur vom p_H 7.4, sondern auch vom p_H 6.2, 8.7 und 9.1 (Prüfung der Dekokte jeweils mit Folienkolorimeter). Dann wurde Filtrierpapier in Streifen von 30 cm Länge und 2 cm Breite geschnitten; diese Streifen wurden in etwa 3 cm Höhe mit einer 1-proz.alkoholischen Cholesterinlösung befeuchtet und getrocknet. Sodann wurden die Streifen zur Kapillarisation 2 Tage in die Dekokte eingetaucht (je 2 Streifen für jedes p_H), ebenso in ein Dekokt von Radix primulae (p_H 7 4) als Vergleichslösung. Es zeigte sich bei allen Proben an der Cholesterinschicht eine dunkle Zone.

---

1) L.Kofler, Arch.d.Pharm.267, 686 (1929).

Die noch feuchten Streifen wurden nun mit Wasser ausgewaschen zur Beseitigung aller wasserlöslichen Verunreinigungen. Etwa vorhandenes Saponin blieb als wasserunlösliche Cholesterinverbindung zurück. Die Streifen wurden getrocknet und am Rückflusskühler 2 Stunden mit Xylol getrocknet, dabei wurde das Saponincholesterid gespalten und das Cholesterin herausgelöst. Nach gründlichem Waschen mit Äther und Trocknen kamen die Streifen, die nunmehr das Saponin angereichert enthielten, in die inzwischen bereitete Blutgelatine.

Diese stellte eine 10-proz. Gelatina alba-Lösung dar, welche mit Puffergemisch vom p_H 6.2, 7.4 und 9.1 unter Zusatz von 0.7 % Kochsalz hergestellt und durch Kochen mit Hühnereiweiß geklärt worden war. Die heiß filtrierte Lösung (Heißwassertrichter) wurde mit 5-proz. Natriumbicarbonatlösung wieder auf das richtige p_H (6.2, 7.4, 9.1) eingestellt (Folienkolorimeter) und dann 3-% defibriniertes, wie oben gewaschenes Blut zugesetzt. Die ca. 35° warme Gelatine wurde in dünner Schicht auf Glasplatten ausgegossen. Nach dem Erstarren wurde immer zwischen zwei Platten ein Filterstreifen gelegt. Es bildete sich, abgesehen von den beiden Streifen von Primula, kein haemolytischer Hof, die Gelatine blieb gleichmäßig undurchsichtig.

Damit war die Abwesenheit von Saponinen in Fructus Cardui Mariae erwiesen.

Gerbstoffe.

In seinem Handwörterbuch der Pharmakognosie nennt W i t t s t e i n (loc cit.) unter den Inhaltstoffen der Mariendistel eisengrünenden Gerbstoff. Bei den Vorproben ergaben sich darauf auch einige Hinweise; die Reaktionen waren jedoch zu allgemein gehalten und hatten daher zu wenig Beweiskraft. Vor allem musste auch klar gestellt werden, welcher Art diese Gerbstoffe sind.

Unter der Bezeichnung Gerbstoffe ist eine Reihe von Pflanzenstoffen zusammengefasst, welche adstringierende Eigenschaften besitzen und in wässriger Lösung Haut in Leder zu verwandeln vermögen. Auf Grund dieser rein technischen Kennzeichnung ist es erklärlich, dass wir keine genau abgegrenzte chemische Stoffklasse vor uns haben. Die Einteilung der Gerbstoffe ist daher von jeher auf Schwierigkeiten gestoßen. F r e u d e n b e r g hat eine Einteilung vorgenommen, welche auf der ungleichen Hydrolysierbarkeit beruht und daher einer Gemeinsamkeit im chemischen Aufbau, worauf sich dann Unterscheidungsreaktionen gründen können, am ehesten gerecht wird. Er unterscheidet zwischen Gallotanninen und Katechingerbstoffen (1). Bei den ersteren sind die Benzolkerne durch Sauerstoffatome zum Komplex vereinigt. Sie lassen sich durch Hydrolyse spalten. Hierher gehören die Ester der Glukose mit Gallussäure oder deren Esteranhydride, insbesondere der Galloylgallussäure, ausserdem die Ester aromatischer Oxycarbonsäuren mit Oxycarbonsäuren, die sogen. Depside. Diesen Gerbstoffen stehen die Katechine gegenüber, deren Kerne durch Kohlenstoffbindungen zusammengehalten werden und durch Kondensation entstehen. Diese sind nicht hydrolysierbar, sondern kondensieren sich mit starken Säuren weiter zu hochmolekularen amorphen Stoffen, den Phlobaphenen oder Gerbstoffroten.

Nachweismethoden. Allen Gerbstoffen gemeinsam ist die Fällbarkeit mit Leimlösungen, Alkaloidsalzen und Bleiacetaten, was wohl in der kolloidalen Natur der Lösungen begründet ist. Weiterhin erhält man Färbungen mit Ferrisalzen. Die Gallotannine bewirken im allgemeinen Eisenbläuung, die Catechine Eisengrünfärbung, jedoch geben auch mehrere Catechine Blaufärbung, sodass diese Reaktion nicht zu einer Gruppeneinteilung herangezogen werden kann, wie es ehe-

1) Wiesner, Die Rohstoffe des Pflanzenreichs. Bd.I, S.811 (1927).

dem der Fall war, wo zwischen eisenbläuenden und eisengrünenden Gerbstoffen unterschieden wurde. Ausserdem kann diese Reaktion in saurem und alkalischem Medium verschieden ausfallen, ja zum Teil ganz unterdrückt werden. Die Catechine werden mit Formaldehyd-Salzsäure und mit Bromwasser ausgefällt, durch Essigsäurebleiacetat fallen die Gallotannine, ebenso durch Schwefelammonium. Die Fällungen sind nicht immer vollständig.

Auf diesen genannten Eigenschaften gründet sich ein allgemeiner Analysengang für Gerbstoffe. Zur Durchführung der Reaktionen wurden folgende Auszüge hergestellt:

1) Ansatz entfettete Droge 10.0 : 200.0 mit kaltem H_2O, 4 Stdn. stehen lassen
2) Ansatz entfettete Droge 10.0 : 200.0 mit heißem H_2O, 4 Stdn. stehen lassen
3) Ansatz fetthaltige Droge 10.0 : 200.0 mit heißem H_2O, 4 Stdn. stehen lassen
4) Ansatz fetthaltige Droge 2.0 : 200.0 mit heißem H_2O, 1 Std. im Wasserbad.

Im Ansatz 1 wurde eine trübe, graue Lösung erhalten, die anderen Lösungen waren gelbbraun und leicht getrübt. Die Reaktion war schwach sauer. Alle 4 Lösungen zeigten in ihren Gerbstoffreaktionen Übereinstimmung.

Allgemeine Reaktionen (1).

Gelatineprobe.

Zu 5 ccm Lösung wurden einige Tropfen 1-proz. Gelatinelösung zugegeben, die 10 % Natriumchlorid enthielt. Es zeigte sich keine Ausflockung.

Strychninprobe.

Zu 3 ccm Drogenauszug wurde tropfenweise Strychnin-

1) Klein, Handbuch der Pflanzenanalyse. Bd.3, 1, S.353. Wasicky, Pharmakognostische Untersuchungen. Teil I, S.219 (1936).

reagenz zugegeben (Strychnin 0.1, NaCl 1.0, Wasser 100 g). Es zeigte sich keine Fällung.

Bleiacetatprobe.

Bei Zugabe von basischer Bleiacetatlösung erfolgte gelblich-weiße Fällung. Diese war allerdings bedeutend schwächer als diejenige, welche von einem Tropfen 10-proz. Gerbsäurelösung hervorgerufen wurde.

Eisenprobe.

10 ccm wurden mit einigen Tropfen 1-proz.Eisenalaunlösung versetzt. Es zeigte sich eine leichte Blaufärbung, welche besonders bei Auszug 1 durch starke Ausfällungen schwer zu erkennen war.

Unterscheidungsreaktionen.

Formaldehydprobe.

50 ccm der Drogenlösung, 5 ccm konz.Salzsäure und 10 ccm 40-proz.Formaldehyd wurden in einem Rundkolben unter Rückfluss 30 Min.zum Sieden erhitzt. Es erfolgte eine sehr voluminöse Ausflockung. Nach dem Erkalten wurde filtriert und 10 ccm des Filtrats mit 1 ccm 1-proz.Eisenalaunlösung geprüft unter Zugabe von 5 g festem Natriumacetat. Die Probe war negativ.

Bromprobe.

Zu einigen ccm Lösung wurde etwas Essigsäure und zu der getrübten Lösung einige ccm Bromwasser gegeben. Es zeigte sich alsbald eine Ausflockung.

Essigsäure-Bleiacetatprobe.

Zu 5 ccm Lösung wurden 10 ccm 10-proz.Essigsäure und sodann 5 ccm Bleiacetatfällung gegeben; es zeigte sich nur eine Trübung.

Schwefelammoniumprobe.

25 ccm Lösung wurden nach Zusatz von 3 Tropfen konz.Schwefelsäure 2 Min. gekocht. Die abgekühlte Lösung wurde mit 5 g Kochsalz 10 Min. stehen gelassen.

3 ccm Filtrat wurden mit 10 ccm Wasser vermischt, welches 15 Tropfen Ammoniumsulfid enthielt. Es entstand keine Ausflockung.

Ausserdem wurden drei weitere Aufschwemmungen der Droge, jeweils in der Konzentration 10.0 : 200.0 angesetzt und 10 g Cortex Quercus, 10 g Cortex Quebracho und 10 g Divi-Divi zugegeben. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 3.

Untersuchung von Carduus marianus auf Gerbstoffe und Vergleichsreaktionen.

Bezeichnung der Proben	Reagenz	Carduus marianus	Quebracho	Quercus	Divi-Divi
a	Gelatine	-	-	+	+
b	Strychnin	-	+	+	+
c	Bleiacetat	+	+	+	+
d	Eisenprobe	schwach+	schwach+	+	+
e	Formaldehyd Fällung	+	+	+	-
	Eisenprobe	-	-	+	+
f	Bromprobefällung .	+	+	+	-
g	Essigsäure-Bleiacetat-Fällung	-	-	+	+
h	Schwefelammonfällung	-	-	+	+

Zusammenfassung. Von den allgemeinen Reaktionen war nur Probe c und d schwach positiv. Die Unterscheidungsreaktionen ließen durch das Auftreten einer Fällung bei Probe e und f auf Catechingerbstoffe schließen, was durch Probe g und h bestätigt wurde. Es kann sich jedoch nur um sehr geringe Mengen von Gerbstoff handeln, welche für eine Heilwirkung wohl kaum in Frage kommen.

Bitterstoffe.

An Abkochungen der fetthaltigen, wie der entfetteten Droge war des öfteren bitterer Geschmack aufgefallen, ebenso schmeckten Auszüge mit verd.Alkohol stark bitter. Da sich die Abwesenheit von Alkaloiden ergeben hatte, andererseits nur ganz geringe Mengen Gerbstoff nachgewiesen werden konnten, musste eine andere Stickstoff-freie Substanz als Träger dieses bitteren Geschmacks angenommen werden. Wenn der Mariendistel überhaupt eine Leber- und Gallenwirkung zukommt, dann scheint dieses bittere Prinzip in erster Linie dabei beteiligt zu sein. Die Untersuchung und Beschreibung solcher Verbindungen schien daher von besonderer Wichtigkeit. Die Bitterstoffe stellen jedoch chemisch keine geschlossene Gruppe von Verbindungen dar. Infolgedessen gibt es auch keine einheitlichen chemischen Nachweismethoden, so dass als einzige aufschlussgebende Möglichkeit Geschmacksproben herangezogen werden. Solche Untersuchungen wurden mit Erfolg auch zur quantitativen Untersuchung von Bitterstoffen vorgeschlagen (1).

Bei den Vorversuchen ergab sich, dass der bittere Stoff in Alkohol von bestimmtem Gehalt löslich sein muss, weshalb verschiedene Extraktionsversuche angestellt wurden. Zunächst wurde eine Mazeration und ein Dekokt gleicher Konzentration mit Wasser angesetzt; nach 4 Stunden zeigte sich das Dekokt viel bitterer, ein Zeichen, dass der fragliche Stoff in der Wärme leichter löslich und nicht hitzeempfindlich ist. Sodann wurden je 10 g Droge mit 50 ccm Alkohol (96-, 70-, 45- und 20-proz.) und mit Wasser eine Stunde lang auf dem Wasserbad ausgekocht; folgendes Ergebnis wurde erhalten:

	Alkohol				
	96-	70-	45-	20-proz.	Wasser
Farbe des Filtrats	gelb	dunkel-gelb	braun	milchig-braun	stark getrübt, milchig
Grad der Bitterkeit	-	+++	+++	++	+

1) Wasicky, Pharm.Monatshefte 1933, Nr.2, S.31.

Die beste Extraktion ergab sich demnach mit 45-proz.Alkohol. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der auch schon anderweitig festgestellten Tatsache, dass 43 % Alkohol das größte Extraktionsvermögen für pflanzliche Inhaltstoffe besitzt. Allerdings muß in Betracht gezogen werden, dass auch die Begleitstoffe in größerer Menge mit herausgezogen werden.

Im Anschluss an diese Vorversuche wurde aus 30 kg Fructus Cardui Mariae ein Trockenextrakt hergestellt. Dabei wurden entfettete Mariendistelfrüchte mit 43-proz.Alkohol perkoliert und das Perkolat mit einem Vakuumtrockenschrank nach S t r a u b zur Trockene eingedampft. Das Trockenextrakt stellte eine dunkelbraune, stark hygroskopische Masse dar, von nachhaltig bitterem Geschmack. Es löste sich in 43-proz. Alkohol klar zu einer schwarzbraunen Lösung. Beim Verdünnen mit Wasser gab es amorphe, trübe Ausscheidungen, ebenso mit 96-proz.Alkohol. Nach Abtrennung der Fällung durch Zentrifugieren wurde sowohl bitterschmeckende Fällung, wie bitteres Zentrifugat erhalten. Mit Säuren erfolgten starke amorphe Ausflockungen unter Rosafärbung der überstehenden Lösung, mit Alkali und Ammoniak ergaben sich klare Lösungen.

Allgemeine Methoden zur Darstellung von Bitterstoffen sind wegen der uneinheitlichen Natur nicht bekannt. Durch direkte Titration mit organischen Lösungsmitteln können Inhaltstoffe bestimmter Art infolge der großen Menge der begleitenden Verunreinigungen nur selten gewonnen werden. Diese müssen vielmehr durch bestimmte Verfahren abgetrennt werden. Man benützt dazu häufig die Eigenschaft der Bleisalze, mit Pflanzensäuren, Schleimen, Eiweißstoffen und Gerbstoffen unlösliche Verbindungen zu bilden. Bitterstoffe von anderer Art, wie die durch Bleisalze fällbaren Verunreinigungen, bleiben dann in Lösung und können auf dem Filtrat erhalten werden. Werden sie jedoch mitgefällt, so müssen die Bleiniederschläge wieder zerlegt werden.

Bleimethode (1).

Nach dieser Methode wurde eine Abkochung der Droge mit 45-proz.Alkohol (100 g Droge + 400 g Alkohol) und eine Auflösung von 100 g Trockenextrakt in 500 g 45-proz.Alkohol untersucht.

1) Zur Fällung im sauren Medium wurde solange 10-proz. Bleiacetatlösung zugegeben, bis nichts mehr ausfiel. Durch Zentrifugieren konnte ein voluminöser, schmutzig grüner Niederschlag abgetrennt werden, welcher dreimal mit 45-proz.Alkohol ausgewaschen wurde. Die eingeengten Waschwässer kamen zum Filtrat, während der Niederschlag mit 96-proz.Alkohol ausgekocht wurde. Der Alkohol wurde abfiltriert, in das essigsaure Filtrat Schwefelwasserstoff eingeleitet und das entstandene Bleisulfat abfiltriert. Der Schwefelwasserstoff wurde mit Kohlendioxyd beseitigt. Nach dem Abdestillieren des Alkohols verblieb nur wenig Rückstand, welcher nicht bitter schmeckte. Der Niederschlag wurde darauf mit 10-proz.Essigsäure versetzt und stehen gelassen, wobei ein Teil in Lösung ging. Zu dieser Lösung wurde alkalische Bleiacetatlösung gegeben, der entstandene Niederschlag in Wasser suspendiert und durch Einleiten von Schwefelwasserstoff zerlegt. Letzterer wurde mit Kohlendioxyd verdrängt und sodann eingedampft. Der Rückstand schmeckte nicht bitter. Ebenso wurde der in Essigsäure unlösliche Teil des Niederschlags behandelt und auch kein bitterer Rückstand erhalten.

2) Zur Fällung im alkalischen Medium wurde tropfenweise mit Bleiessig versetzt, bis sich keine Fällung mehr zeigte. Der gelbe Niederschlag wurde gewaschen, mit 96-proz.Alkohol ausgekocht und wie oben behandelt. Es blieb kein Rückstand. Die Niederschlag selbst wurde in Wasser suspendiert, mit Essigsäure angesäuert und wie oben behandelt. Es konnte ebenfalls kein bitterer Rückstand erhalten werden.

---

1) Klein, Handbuch der Pflanzenanalyse. Bd.1, S.593.

3) Das Filtrat der Bleiessigfällung wurde mit verd. Schwefelsäure entbleit und die Schwefelsäure mit Kalilauge neutralisiert. Die trübe Lösung schmeckte schwach bitter. Sodann wurde der Alkohol abdestilliert und die Lösung dreimal mit Äther ausgeschüttelt. Die ätherische Ausschüttelung wurde kurz mit Calciumchlorid getrocknet und dann der Äther abdestilliert. Es hinterblieb ein klebriger brauner Rückstand, welcher durch äusserst scharfen Geschmack auffiel, worüber später noch berichtet wird.

Eine weitere Ausschüttelung mit Chloroform blieb ohne Ergebnis. Die wässrige Lösung wurde im Vakuum zur Trockene verdampft, der Rückstand schmeckte nicht bitter.

Ergebnis. Der bittere Stoff befand sich demnach im Filtrat der Bleifällung, doch ließ er sich durch diese Methode nicht anreichern.

Tanninverfahren.

Da die Bleimethode nicht befriedigte, wurde ein Dekokt aus 100 g Droge und 400 g Wasser mit Gerbsäure im Überschuss versetzt. Dadurch werden häufig Bitterstoffe ausgefällt. Der entstandene Tanninbitterstoff-Niederschlag wurde mit frisch gefälltem Bleihydroxyd behandelt und mit Alkohol ausgeschüttelt. Im Rückstand der alkoholischen Lösung ließ sich jedoch kein Bitterstoff nachweisen.

Direkte Extraktionen.

Nachdem die vorstehend beschriebenen Methoden keine Anreicherung des bitteren Prinzips gebracht hätten, wurde versucht, unter Verzicht auf chemischen Agentien durch direkte Extraktion zum Ziele zu gelangen. Zu diesem Zweck wurden die verschiedensten Lösungsmittel hinsichtlich ihres Lösungsvermögens auf die Extrakte untersucht. Es galt festzustellen, welches Lösungsmittel ein möglichst bitteres Extrakt ergab, bei welchem gleichzeitig die Menge der Verunreinigungen nicht

zu groß wurde und welche Lösungsmittel überhaupt nichts von dem bitteren Prinzip herauslösten. Damit konnte sich eine Möglichkeit bieten, durch aufeinanderfolgende Extraktionen soviel Beimengungen aus dem Extrakt zu beseitigen, dass letzten Endes nur noch reiner Bitterstoff im Extrakt übrigblieb. Für diese Versuche war möglichst erschöpfende Extraktion erforderlich und nach Möglichkeit Einhaltung gleicher Bedingungen. Das zur Verwendung gelangende Extrakt war sehr hygroskopisch und wurde daher mit Sand verrieben, damit ein Verbacken unmöglich war. Je nach Siedepunkt des Lösungsmittels bediente man sich zur Extraktion des Soxhlet-Apparates, von 76° an wurde unter Rückfluss auf dem Wasserbad gekocht und ab 100° mit einem Babotrichter über direkter Flamme. Die Extrakte wurden nach Abdestillieren des Lösungsmittels auf Bitterkeit untersucht. Die Versuchsergebnisse wurden in Tabelle 4 (siehe Seite 49) zusammengestellt.

Aus der Aufstellung ließ sich ersehen, dass es durch keines der angewandten Lösungsmittel gelingt, das bittere Prinzip vollständig zu erschöpfen, immer zeigten auch die Rückstände noch bitteren Geschmack. Rein mengenmäßig wurde mit den Alkoholen, sowie mit Aceton und Essigester eine gute Ausbeute erzielt. Benzol, Pentan, Tetrachlorkohlenstoff können ausgeschieden werden, da weder Verunreinigungen noch bittere Substanz in nenneswerter Menge erhalten wurden. Am besten schien sich Chloroform und Äther zu eignen, da hierbei der harzig-bittere Geschmack am ausgeprägtesten war. Es fiel auf, dass die Bitterkeit der Rückstände erst beim Lösen in 45-proz. Alkohol auftrat oder nach längerem Kochen in Wasser, wobei sich gewöhnlich stark getrübte Lösungen ergaben, ein Zeichen, dass der fragliche Stoff schwer wasserlöslich ist.

Aufeinanderfolgende Extraktion derselben Droge mit verschiedenen Lösungsmitteln.

Auf den beschriebenen Untersuchungen aufbauend wurden Aceton, Chloroform, Äther und Methylalkohol zu

einer fortlaufenden Extraktion derselben Drogenmenge herangezogen. Besonders die Acetonextraktion hatte einen stark klebrigen Rückstand ergeben, der allerdings auch sehr bitter schmeckte. Infolgedessen schien Aceton geeignet, den stark hygroskopischen Anteil, welcher das Verkleben der Extrakte veranlasste und weitgehend störend wirkte, zu beseitigen. Der Verlust eines Teils des bitteren Stoffs musste in Kauf genommen werden. Chloroform und Äther lösen ausser einem harzig bitteren Stoff noch einen öligen Anteil, welcher ebenfalls vorher abgetrennt werden musste. Der Versuch sollte ergeben, ob dazu besser Chloroform oder Äther geeignet war. Die Extraktionen wurden je 10 Stunden im Soxhlet durchgeführt, als Ausgangsmaterial dienten 425 g Droge, welche vorher im Exsikkator sorgfältig getrocknet worden waren.

1) Acetonextrakt. Nach ca.4 Stunden schied sich an der Kolbenwand eine gelblich-weiße Masse ab. Im übrigen wurde eine gelbe Lösung erhalten, aus der beim langsamen Erkaltenlassen neben einem amorphen gelben Rückstand farblose Prismen ausfielen. Die gelbe Lösung, welche die Mutterlauge darstellte, wurde abgegossen und zur Trockene verdampft. Der Rückstand betrug insgesamt etwa 8 g.

Die Prismen waren sehr leicht wasserlöslich, im Gegensatz zu dem amorphen Teil des Rückstandes und konnten auf diese Weise leicht abgetrennt werden. Ihre Lösung schmeckte jedoch nicht bitter, weshalb ihre Beschreibung in einem besonderen Kapitel vorgenommen werden soll (siehe S.67).

Der gelbbraune amorphe Rückstand löste sich in 45-proz. Alkohol und zeigte stark bitteren Geschmack. Die Lassaigne'sche Stickstoffprobe war negativ. Da es sich sehr wahrscheinlich um keine einheitliche Substanz handelte - es erfolgte beim Erhitzen Braunfärbung unter Zersetzung - wurde von einer Schmelzpunktsbestimmung abgesehen. Eine wässerige Anschüttelung des Extraktes ergab kräftige Reduktion der

Tabelle 4.

Ergebnis der Untersuchung von Carduus marianus auf Bitterstoffe. Eigenschaften des Trockenrückstandes.

Lösungsmittel	Siedepunkt Grad	Extraktmenge in g	Dauer d. Extrakt. Stdn.	Farbe der Lösung	Eigenschaften des Trockenrückstandes					Geschmack des Extraktionsrückstandes
					Menge	Farbe	Geruch	Geschmack	Geschm. in 45-proz. Alk.	
	1	2	3	4	5					6
Äther	34.6	10	12	fast farblos	wenig	gelbgrün, harzig und ölig	abstoßend	schwach bitter	bitter	stark bitter
Pentan	36	10	6	farblos	-	-	ätherisch	-	-	bitter
Benzol	80.5	10	4	farblos	wenig	gelblich, ölig	neutral ölig	neutral	-	bitter
Chloroform	61.2	20	6	gelb	wenig	gelb, harzig, dünnflüss. Öl	aromatisch	neutral	stark bitter	bitter
Tetrachlorkohlenstoff	76.7	10	1	farblos	-	-	-	neutral	-	bitter
Methylalkohol	64.7	10	6	rotbraun	viel	zäh rotbraun,	-	würzig-salzig	bitter	schwach bitter
Butylalkohol	117.7	10	1	rotbraun	viel	dunkelbraune Schmiere	-	brennend scharf	-	bitter
Amylalkohol	138	10	1	rot-	viel	zähflüssige, rotbraune Schmiere	-	brennend scharf	-	bitter
Aceton	56.1	10	6	gelb	viel	braun, wie Honig	aromatisch	harzig	stark bitter	schwach bitter
Essigester	77	10	4	gelb	reichlich	gelb	-	harzig	stark bitter	bitter
Pyridin ...	115.5	10	2	schwarzbraun	viel	schwarze, zähflüssige Schmiere	-	scharf	-	bitter

Fehling'schen Lösung. Mit 12-proz.Salzsäure destilliert, entstand Furfurol, das mit Anilinextrakt nachgewiesen wurde.

2) Chloroformextrakt. Die mit Aceton ausgezogenen 117 g Droge wurden in gleicher Weise mit Chloroform behandelt. Es ergab sich eine gelbe Lösung, aus der nach dem Abdestillieren des Chloroforms eine gelbe, von einer dünnen öligen Schicht bedeckte, amorphe Masse, insgesamt etwa 3 g, zurückblieb. Sie war frei von Stickstoff und löste sich nicht in Wasser und Säuren, nur teilweise war sie löslich in Äther, leicht dagegen in 45-proz. Alkohol und Kalilauge.

Eine Anschüttelung mit Wasser zeigte nur schwache Reduktion Fehling'scher Lösung. Es wurde nun untersucht, ob sich bei einer Destillation im strömenden Wasserdampf irgendwelche Spaltprodukte ergeben, welche unter Umständen auf einen hydrolysierbaren Stoff hindeuten konnten. Das übergehende Destillat war anfangs ganz klar; im Lauf der Zeit erfolgte jedoch Trübung, einzelne weiße Flocken schwammen in dem Destillat. Je länger die Destillation fortgesetzt wurde, desto mehr Abscheidungen eines wachsartigen Körpers wurden an der Kühlerwand beobachtet. Dieser Umstand legte die Vermutung nahe, dass es sich dabei um eine sekundäre Bildung handle. Der fragliche Stoff ließ sich leicht mit Äther ausschütteln und erwies sich identisch mit dem bei den Vorprüfungen durch Wasserdampfdestillation erhaltenen flüchtigen Öl (siehe S.14). Insgesamt wurden 4 Liter überdestilliert.

Der Rückstand, der ursprünglich in Wasser vollkommen unlöslich war, stellte keine einheitliche Masse mehr dar. An den Wandungen des Schnürkolbens hatte sich eine zähflüssige, braune Schmiere abgeschieden. Die überstehende Flüssigkeit war milchig getrübt und von stark bitterem Geschmack, ihre Reaktion, welche ursprünglich neutral war, war schwach lackmussauer geworden. Fehling'sche Lösung wurde zwar auch nicht

sofort reduziert; es schied sich aber nach kurzem Kochen rotes Kupferoxydul in reicher Menge ab. Durch den Polarisationsapparat ließ sich keine Drehungsänderung feststellen, da die Lösungen trübe blieben. Die trübe Lösung wurde im Vakuum zur Trockene eingedampft. Der in Alkohol gelöste Rückstand schmeckte stark zusammenziehend bitter und schien eine gewisse Einheitlichkeit in der Zusammensetzung aufzuweisen. Jedenfalls war das bittere Prinzip in der Hitze nicht zerstört worden und die wachsartigen Flocken mussten durch Hydrolyse eines anderen Inhaltstoffes entstanden sein.

3) Ätherextrakt. In gleicher Weise wurde mit Äther erschöpfend extrahiert, wobei eine farblose Lösung erhalten wurde. Bei vorsichtigem Eindunsten zeigte sich ein Rückstand von 0.3 g, der sich durch widerlich abstoßenden Geruch und überaus scharfen Geschmack auszeichnete. Stickstoff konnte nicht nachgewiesen werden. Diese scharfe Substanz wird in einem späteren Kapitel näher beschrieben (siehe S.59).

4) Methylalkoholextrakt. Zum Schluss wurde noch mit Methylalkohol ausgezogen und ein brauner Rückstand erhalten, der wiederum bitter schmeckte. Die Stickstoffprobe war positiv. Ausserdem war eine größere Menge Verunreinigungen vorhanden.

Leider war es durch diese Extraktionen nicht möglich geworden, eine hinreichende einheitliche Form des bitteren Stoffs zu erhalten, welche vor allem soweit frei von Verunreinigungen war, dass sie durch Kristallisierbarkeit und Schmelzpunktsbestimmung hätte charakterisiert werden können.

Tierkohle-Adsorptionsverfahren.

Bestimmte Stoffe haben auf Grund ihrer Oberflächenaktivität ein großes Adsorptionsvermögen. Diese Eigenschaft kann dazu benützt werden, um sie von den Stoffen geringerer Affinität abzutrennen, wodurch eine weitgehende Anreicherung wirksamer Stoffe ermöglicht werden kann.

Im vorliegenden Falle wurde Tierkohle als Adsorptionsmittel verwendet und von 100 g Droge ausgegangen. Diese wurden dreimal mit 500 ccm Wasser ausgekocht und die bitter schmeckenden, getrübten Filtrate im Vakuum auf 200 ccm eingeengt. Alsdann wurde 1/2 Std. lang mit Tierkohle gekocht, die Kohle heiß abgenutscht und mit kaltem Wasser nachgewaschen. Das durch Absaugen erhaltene Filtrat schmeckte nur noch schwach bitter.

Durch einstündiges Auskochen der Tierkohle mit 96-proz.Alkohol am Rückflusskühler wurde eine gelbe Lösung erhalten und, als diese von Alkohol befreit war, ein zähflüssiger gelber Rückstand, welcher süßlich und zugleich bitter schmeckte. Dann wurde in abs.Alkohol gelöst und Äther zugegeben. Dabei flockte eine amorphe, käsigweiße Masse aus, welche abfiltriert und mit Äther gewaschen wurde. Sobald diese Substanz der Luft ausgesetzt wurde, bräunte sie sich und bildete eine zerfließliche Masse. Diese schmeckte nicht bitter, reduzierte Fehling und ist wohl unter die Kohlehydrate zu rechnen. Auch bei Zugabe von Chloroform erfolgte eine ähnliche weiße Ausfällung. Die eingedampften und mit 45-proz.Alkohol wieder aufgenommenen Filtrate schmeckten stark bitter. Das Chloroform schien auch hier zur Herauslösung des bitteren Anteils sehr geeignet.

Schon in alten Mitteilungen wird gelegentlich darauf hingewiesen, dass insbesondere in den Schalen von Fructus Cardui Mariae ein Bitterstoff enthalten sein soll. Bei der pharmakognostischen Beschäftigung mit der Droge wurde beobachtet, dass sich diese Schalen von der Frucht selbst abtrennen lassen. Für einen Versuch wurde deshalb die zwar sehr mühsame Arbeit unternommen, eine entsprechende Menge Früchte von den Schalen zu befreien. Als Ergebnis einer 14-tägigen Mazeration des Rückstandes konnte gezeigt werden, dass die von der Samenschale befreiten Früchte keinerlei bitteren Stoff enthalten.

So können viele Ballaststoffe ausgeschaltet werden, wenn nur die Schalen extrahiert werden, was wiederum eine Anreicherung des bitteren Prinzips bedeutet.

Zum Versuch selbst wurden dann 50 g Schalen wiederholt mit Wasser ausgekocht und die im Vakuum eingeengten Filtrate mit Tierkohle erhitzt. Die getrocknete Kohle wurde dieses Mal sofort mit Chloroform ausgekocht, der gelbe Rückstand mit 45-proz.Alkohol aufgenommen. Beim Einengen dieser Lösung trat Trübung und weiterhin grobe Ausflockung ein. Unter dem Mikroskop erschienen diese Flocken als eine Anhäufung von stark lichtbrechenden gelben Tröpfchen, Kristalle waren nicht zu erkennen. Bei Zusatz von einigen Tropfen Salzsäure fielen in der fast wässerigen Lösung weitere Massen kleiner Tröpfchen aus. Nach Zugabe von Alkali trat wiederum Auflösung ein. Die „Öltröpfchen" zeigten große Ähnlichkeit mit dem Bild, das man bei der Untersuchung einer sauren Aufschwemmung von Harzen erhält. Als Beweis, dass keine Täuschung durch wirkliche Öltropfen vorlag, welche in geringer Menge den Fruchtschalen anhaften oder sekundär entstanden sein konnten, wurde zur Trockene verdampft und der braune Rückstand ein paar Mal mit Petroläther geschüttelt. Nach dessen Abdunsten wurde wieder in 45-proz.Alkohol gelöst; es zeigte sich unter dem Mikroskop dasselbe Bild, auch schmeckte die Lösung wieder bitter. Fehling'sche Lösung wurde reduziert. Mit 12-proz.Salzsäure destilliert, entstand Furfurol, welches mit Anilin-Eisessig nachgewiesen wurde.

Die durch Adsorption mit Kohle erhaltene bitter schmeckende Lösung zeigte in ihren Eigenschaften weitgehende Ähnlichkeit mit den durch direkte Extraktion mit Chloroform gewonnenen Lösungen, sodass durch die Tierkohleadsorption weder bei den ganzen Früchten noch bei den Schalen allein eine Verbesserung der Methode offensichtlich wurde. Vor allem wurden von der Kohle nicht nur die Bitterstoffe, sondern auch ein Großteil der anderen Beimengungen gebunden. Durch

direkten Auszug der Schalen dürfte der günstigste Erfolg erzielt werden. Auch mit 96-proz.Alkohol kann extrahiert werden, nur müssen dabei vor weiterer Untersuchung Beimengungen mit Äther gefällt werden.

Chromatographische Adsorptionsanalyse.

Nach den Erfolgen, welche man in neuerer Zeit bei der Reindarstellung von Pflanzenstoffen mit der chromatographischen Adsorptionsanalyse erzielt hatte, sollte auch diese Methode bei den Versuchen zur Aufarbeitung der bitteren Komponente Berücksichtigung finden. Zu diesem Zweck wurden 10 ccm einer aus 10 g Fruchtschalen mit 45-proz. Alkohol hergestellten Tinktur, welche besonders bitter schmeckte, auf eine Säule Aluminiumoxyd gegossen, die durch Glühen von Aluminiumhydroxyd erhalten worden war. Von diesem Adsorptionsmittel werden einzelne Stoffe auf Grund verschiedener Adsorptionsaffinität verschieden stark gebunden, um dann mit einem geeigneten Lösungsmittel zu einem Chromatogramm ausgewaschen zu werden. Als Waschwasser wurde 96-proz.Alkohol verwendet. Nach dem Durchlauf durch die obersten Schichten von Aluminiumoxyd war die ursprünglich rotbraune Tinktur schmutzig-grün gefärbt und nahm schließlich bei weiterem Vordringen eine gelbe Farbe an, die sich beim Auswaschen auf das ganze Aluminiumoxyd ausdehnte. Sonst war auch unter der Analysenquarzlampe keinerlei Zonenbildung festzustellen. Die abfließende farblose Lösung leuchtete unter der Quarzlampe blau auf, sie schmeckte jedoch nicht bitter. Bei längerem Auswaschen wurde ein gelbes, bitter schmeckendes Filtrat erhalten, während das Aluminiumoxyd gefärbt blieb. Offenbar wurde ein Teil des gelben Stoffes unter Salzbildung zurückgehalten. Beim Versetzen des aus der Röhre entfernten gelben Aluminiumoxyds mit 45-proz.Alkohol, dem 1 % Schwefelsäure zugesetzt war, zeigte sich ein leuchtend rotes, klares Filtrat, während das Aluminiumoxyd wieder rein weiß erschien.

Die Farbänderungen wiesen auf einen in der Schale enthaltenen Farbstoff hin. Sie können dadurch ihre Erklärung finden, dass die rotgefärbte, sauer reagierende Tinktur mit als Alkali wirkendem Aluminiumoxyd in geringer Menge in Reaktion getreten war. Daher zeigte sich bei fortschreitender Neutralisation der Tinktur eine Grünfärbung und weiterhin im alkalischen Medium eine Gelbfärbung, welche in dem 96-proz. Alkohol erhalten blieb.

Bei Verwendung eines sauren Adsorptionsmittels, wie es Kaolin darstellte, traten diese Farbumschläge nicht ein. Die Lösung lief sehr schwer durch. Auch hierbei konnte keine Zonenbildung festgestellt werden. Der Farbstoff war demnach saurer Natur.

Die Farbänderungen standen im Einklang mit den Beobachtungen, welche beim Alkalisieren der wässrigen Drogenauszüge gemacht wurden (siehe S.30). Diese zeigten je nach dem Grad der sauren Reaktion Rosa- bis starke Rotfärbung. Solange die Lösungen nur lackmusalkalisch waren (bis p_H = 8.0) erhielt man eine schmutzige, graugrüne Mischfarbe, welche bei Phenolphtaleinalkalität in gelb überging. In alkalischem Medium erfolgte auch gewöhnlich Klärung sämtlicher Lösungen.

Im Zusammenhang mit dieser Methode, die für die Anreicherung des bitteren Prinzips keinen Vorteil erkennen ließ, konnten die Farbumschläge bei Carduus marianus-Auszügen näher beschrieben werden. Es muß sich um einen Farbstoff von saurem Charakter handeln, der sich wie ein Säure-Basenindikator verhält, von allerdings weitem Umschlagsgebiet. Er muss als ein Inhaltstoff der Fruchtschalen angesehen werden. Ob diese gefärbte Komponente in näherer Beziehung zu dem bitteren Stoff selbst steht, vielleicht sogar mit ihm identisch ist, konnte nicht entschieden werden.

Zusammenfassend muß aus den Prüfungen nach dem bitteren Prinzip gefolgert werden, dass es sich dabei

um einen Stoff von sauerem Charakter handeln muss, da sich mit Laugen klare Lösungen ergaben. Mit Wasser wurden milchig-trübe Auskochungen erhalten, in Alkohol erfolgte Lösung. Es dürfte sich nach dem mikroskopischen Bild und dem chemischen Verhalten um eine Harzsäure handeln. Der Stoff ist nur in den Schalen enthalten.

Untersuchung der Schalen.

Da die in den vorhergehenden Abschnitten beschriebenen Untersuchungen deutlich ergeben hatten, dass von der Frucht von Carduus marianus vornehmlich die Schalen als die Träger von Inhaltstoffen besonderen Charakters in Frage kommen, wurde trotz der großen Mühe, die mit der Abtrennung der Schalen verbunden ist, mit diesen noch einmal ein Analysengang auf verschiedene Verbindungsgruppen durchgeführt, die für eine therapeutische Wirkung am ehesten in Betracht kommen.

Extraktion mit 1-proz. Salzsäure. 5 g Schalen wurden mit 1-proz. Salzsäure 1/2 Stunde auf dem Wasserbad gekocht. Dabei wurde ein klares leuchtendrotes Filtrat erhalten. In diesem zeigten Mayers und Dragendorffs Reagenz, ebenso Phosphorwolframsäure und Jod-Jodkali eine Fällung, Tannin eine Trübung.

Abkochung. 3 g Schalen wurden mit 50 ccm Wasser 1/2 Stunde auf dem Wasserbad erwärmt. Es hinterblieb ein trübes, schwach rosagefärbtes Filtrat von schwach saurer Reaktion. Bei Zugabe von 1 Tropfen stark verdünnter Eisenchloridlösung erfolgte Blauviolettfärbung, welche allmählich in braun überging. Mit Bleiacetatlösung wurde eine gelbgrüne Fällung erhalten. Fehling'sche Lösung wurde nur ganz schwach reduziert. Bei Zugabe des stark verdünnten Reagenz zeigte sich Grünfärbung, erst nach längerer Zeit eine Abscheidung von rotem Kupferoxydul.

Alkaloidextraktion. 30 g Schalen wurden mit 15-proz.Kalilauge alkalisiert und getrocknet und sodann mit Chloroform 12 Stunden lang extrahiert. Die gelbliche Lösung ergab nach dem Eindampfen eine gelbe, harzige und aromatisch riechende Masse. Diese wurde mit 20 ccm 1-proz.Schwefelsäure ausgekocht und dann filtriert. Im Filtrat war Mayer, Dragendorff, Phosphorwolframsäure, Jod-Jodkali positiv, Gerbsäure negativ. Beim Alkalisieren schieden sich allmählich feine Flocken aus. Diese wurden abfiltriert und getrocknet. Es blieb nur ein ganz geringer Rückstand. Ein Lösungsversuch mit heißem Chloroform war erfolglos. Die Stickstoffprobe war negativ; es war anzunehmen, dass hierfür zu wenig Substanz vorlag. Jedenfalls konnte sich auch aus diesen Proben ein Vorkommen von Alkaloiden nicht ergeben.

Scharfe Substanz. Darstellung und Eigenschaften.

Es war auffallend, dass ätherische Extrakte nach Abdunsten des Äthers einen widerlich stickenden Geruch hinterließen. Die Rückstände, die immer nur in geringer Menge auftraten, waren jedoch ohne besonderen Geschmack und erwiesen sich als wasserunlöslich. Im Verlauf der Bitterstoff-Aufarbeitung zeigte jedoch eine ätherische Ausschüttelung des Filtrats, das aus den beiden Bleifällungen erhalten wurde, nach Abdestillieren des Äthers auf der Zunge einen anhaltenden, intensiv scharfen Geschmack, wobei auch der charakteristische Geruch beobachtet werden konnte. Dieselben Eigenschaften ließ auch das durch Vorextraktion mit Aceton und Chloroform gereinigte Ätherextrakt erkennen; dieser Rückstand war nur schwach gelb gefärbt, während die anderen gelbbraun waren, und schien daher die größte Reinheit zu besitzen. Auch durch Ätherextraktion der Tierkohle, welche aus der Abkochung der Schalen erhalten worden war, wurde diese scharfe Substanz gewonnen, sodass sie wohl ebenfalls

als ein Inhaltstoff der Schalen anzusehen ist. Ausserdem wurde bei der noch zu besprechenden Aufarbeitung der Droge auf Tyramin im letzten Rückstand der widerlich abstoßende Geruch erhalten.

Auffallend war, dass bei einer direkten Extraktion der Schalen mit Äther der scharfe Geschmack durch ölige Beimengungen verdeckt und der aus der Ätherextraktion sich ergebende scharfe Rückstand gewöhnlich noch braun gefärbt war, sofern nur mit Aceton und nicht mit Aceton und Chloroform zugleich vorextrahiert worden war. Andererseits durften die Vorextraktionen nicht zu lange durchgeführt werden, da namentlich Chloroform neben den störenden Beimengungen auch die scharfe Substanz löste, sodass im Ätherextrakt nur noch Spuren davon vorzufinden waren. Als günstige Zeitdauer für die Vorextraktion können 8-10 Stunden vorgeschlagen werden. Beim Abdunsten der Ätherextraktionen empfiehlt es sich, keine Gefäße mit breitem Boden zu wählen, wie z.B. Erlenmeyer oder Rundkolben, da hierbei noch vorhandene Beimengungen ihre einschließende Wirkung in größerem Maße entfalten können und eine größere Oberfläche für die Oxydation geschaffen wird. Am besten bewährte sich das Einengen in Reagierzylindern, wobei gegen Ende des Abdunstens 2-3 Tropfen Chloroform zugegeben wurden, welches auf Grund seiner geringeren Flüchtigkeit am Boden des Glases die harzigen Verunreinigungen in Lösung hielt, während das scharf schmeckende Prinzip sich in feinen weißen Flocken an den Wandungen abschied und so gewonnen werden konnte. Das Chloroform besitzt offenbar eine größere Lösungstendenz für die vorhandenen Verunreinigungen. Dies bewies auch eine Chloroformextraktion der Schalen im Soxhlet, welche nur einen harzigen Rückstand ergab. Der scharfe Geschmack der Flocken ließ bei Aufbewahren an der Luft rasch nach, ein Beweis dafür, dass die scharfe Substanz sehr leicht oxydabel ist.

Geschmacksprüfungen der Rückstände der verschiedenen beschriebenen ätherischen Extrakte ergaben für die scharfe Substanz ein einheitliches Bild, sodass für diese folgende Eigenschaften angegeben werden können:

Leicht löslich in 45- und 96-proz.Alkohol, Amylalkohol, Äther,
weniger leicht löslich in heißem Wasser (reagiert sauer), Chloroform, Aceton,
unlöslich in kaltem Wasser.

Fällbar mit Phosphorwolframsäure,
nicht fällbar mit Bleisalzen und Bariumhydroxyd.
Frei von Stickstoff.
Mit konz.Salzsäure Grünfärbung, mit konz.Schwefelsäure rotbraun, Unterschichten der ätherischen Lösung mit konz.Schwefelsäure ergibt Grünfärbung.

Die Ausbeute an scharfer Substanz, die bei den Versuchen in Flocken ausfiel, war jedesmal sehr gering, ein Schmelzpunkt konnte nicht bestimmt werden.

Gelegentlich der im Abschnitt „Amine" beschriebenen Versuche wurde auch ein scharf schmeckender Rückstand erhalten, der mit dieser scharfen Substanz identisch zu sein schien. Er wurde mit Tyrodelösung angeschüttelt und nach einer von einem medizinischen Sachverständigen vorgeschlagenen Methode an frischem Meerschweinchendünndarm auf seine physiologische Wirksamkeit geprüft +). Dabei zeigte sich eine Einwirkung auf die Kontraktionsfähigkeit des Dünndarms, woraus man ableiten darf, dass auch dieser Substanz eine physiologische Wirkung zukommt, unter Umständen sogar eine therapeutische, was aber nur durch eine

+) Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Professor Dr.med., Dr.phil. F. F i s c h l e r für die freundliche Beratung und Durchführung der angegebenen Versuche meinen besten Dank zum Ausdruck zu bringen.

große Reihe von Versuchen endgültig festgestellt werden könnte. Über die Durchführung der physiologischen Versuche siehe auch Abschnitt „Amine" (S.69).

Der in einem Reagenzglas erhaltene dickflüssige Rückstand, welcher die scharf schmeckenden Flocken enthielt, wurde in 45-proz.Alkohol gelöst; dabei konnte, auch beim Stehenlassen über Nacht, keine Reduktionswirkung der Fehling'schen Lösung beobachtet werden. Die Lösung wurde sodann der Wasserdampfdestillation unterworfen, bis ca. 1 Liter übergegangen war. Es destillierte, anfangs in geringer Menge, später jedoch immer reichlicher, ein wachsartiger Körper über, welcher sich mit Äther ausschütteln ließ. Nach Abdunsten des Äthers blieben Öltröpfchen zurück, die aller Wahrscheinlichkeit nach identisch waren mit dem flüchtigen Öl, welches bei der Wasserdampfdestillation der Droge und des Chloroformextrakts erhalten worden war. Daraus ergab sich die bemerkenswerte Folgerung, dass der mit Wasserdämpfen flüchtige Anteil aus der scharfen Substanz entstanden sein musste, dass es sich also in dem festgestellten ätherischen Öl um eine sekundäre Bildung, wahrscheinlich ein Spaltprodukt handeln musste. Diese Vermutung wurde noch bekräftigt, als sich nach Eindampfen des trüben Destillationsrückstandes im Vakuum auf ca.50 ccm mit Fehling'scher Lösung eine Reduktion feststellen ließ; sie bestand in einer Grünfärbung der Lösung, aus der sich rotes Kupferoxydul abschied. Als weiteres Spaltprodukt kam also ein aldehydischer Körper, wahrscheinlich ein Monosaccharid in Betracht, sodass in der scharfen Substanz ein Glykosid angenommen werden darf. Bei einer ganzen Reihe von Glykosiden ist ja auch eine Spaltung bereits beim Erhitzen mit Wasser bekannt (1).

---

1) vgl. van Rijn, Die Glukoside, 1931.

Ätherisches Öl.

Darstellung.

Auf Seite 14 und Seite 61 sind Untersuchungen beschrieben, bei denen ein mit Wasserdämpfen flüchtiges Öl erhalten wurde. Da der Petroläther auch für ätherisches Öl ein gutes Lösungsmittel darstellt, bestand die Möglichkeit, dass bei der Entfettung der Droge auch das ätherische Öl mitextrahiert worden war. Deshalb wurde das fette Öl zunächst auf einen etwaigen Gehalt an ätherischem Öl untersucht. Zu diesem Zweck wurden 100 g fettes Öl der Wasserdampfdestillation unterworfen. Nach Destillation von 500 ccm waren weder im Kühler Abscheidungen festzustellen, noch konnten Flocken im Destillat beobachtet werden. Dasselbe Ergebnis wurde erhalten, als man von den Schalen befreite Früchte mit Wasserdampf destillierte. Damit war auf der einen Seite erwiesen, dass auch das flüchtige Öl ausschließlich in den Fruchtschalen enthalten ist. Weiterhin ergab sich, dass das ätherische Öl nicht primär in der Pflanze enthalten ist; denn sonst wäre es mit Petroläther herausgelöst worden. Es war in diesem Lösungsmittel, wie sich später bestätigte, leicht löslich. Entfettete wie fetthaltige Droge enthielt die flüchtige Substanz in gleicher Weise. Im allgemeinen gehen ätherische Öle mit Wasserdampf in wenigen Stunden quantitativ über, wobei der Hauptteil gewöhnlich schon in den ersten 100 ccm enthalten ist. Bei der Wasserdampfdestillation von Fructus Cardui Mariae ging am Anfang überhaupt nichts über, erst allmählich traten die Flocken im Destillat auf und reicherten sich nur langsam an, ein weiterer Beweis dafür, dass es sich bei dem Öl um eine sekundäre Bildung handelt, welche einer fortlaufenden Hydrolyse ihre Entstehung verdankt.

Aus diesem Grund wurde eine quantitative Erfassung sehr erschwert. 100 g fetthaltige, gewulver-

te Droge wurden möglichst lange destilliert. Als nach 3 Litern Destillat immer noch kein Ende abgesehen werden konnte, wurde die Bestimmung abgebrochen. Durch zeitweiliges Abstellen der Kühlung wurde eine vollständige Entfernung der wachsartigen Abscheidungen aus dem Kühler erreicht. Das Destillat wurde dreimal mit je 100 g Pentan ausgeschüttelt. Da dieses vor Äther den Vorzug hat, dass es kein Wasser mit aufnimmt, so konnte durch vorsichtiges Eindunsten der Ölgehalt direkt bestimmt werden. Der wachsartige Rückstand betrug 0.0778 g = etwa 0.08 %. Der Gehalt an ätherischem Öl ist also gering.

Für eine nähere Untersuchung war es notwendig, das ätherische Öl, das ja ohne Zweifel ebenfalls für eine therapeutische Wirkung in Frage kommen kann, in größerer Menge zur Verfügung zu haben. Deshalb wurden in einem Großversuch 40 kg entfettete Droge zweimal einer erschöpfenden Wasserdampfdestillation unterworfen. Dabei fielen 100 kg Destillat an, das mit Äther ausgeschüttelt wurde. Es konnten so 40 g des flüchtigen Öles erhalten werden, wodurch sich ein Gehalt von 0.1 % ergibt.

Im folgenden soll dieses Öl nähere Beschreibung finden.

Physikalische Untersuchung.

Das Öl stellte eine leicht gelb gefärbte Flüssigkeit dar, von harzig herbem, charakteristischem Geruch und fadem Geschmack. Beim Erhitzen entstanden widerlich riechende, brenzlige Dämpfe.

Im Siedepunkt-Bestimmungsapparat des DAB.VI (1) ging bei 314° der Hauptteil als gelbliches, brenzlig riechendes Öl über, während ein schwarzer Rückstand übrigblieb.

---

1) DAB.VI, S.45. Allgemeine Untersuchungen. 1929.

Zur Bestimmung der Dichte bediente man sich des Ostwald-Sprengler'schen Pyknometers:

$D\ \frac{19^{\circ}}{4^{\circ}} = 0.8682$ (Mittelwert von zwei Bestimmungen)

Als absolutes Drehungsvermögen wurde durch Polarisation im Halbschattenapparat in einem 100 mm-Glasrohr eine Rechtsdrehung von $\alpha_D^{20^{\circ}} = + 0.53^{\circ}$ im Mittel festgestellt.

Mit dem Refraktometer nach Abbé ergab sich bei einer Temperatur von 20° ein Brechungsindex von $n_D^{20^{\circ}} = 1.4662$ im Mittel.

Das Öl mischte sich leicht mit Äther, Petroläther, Benzol, Toluol, Chloroform, Essigester, Amylalkohol und Pyridin, ausserdem beim Erwärmen mit Aceton, abs. Alkohol und 80-proz.Alkohol. Nicht mischbar war es mit 70-proz. Alkohol, Wasser und Eisessig.

Chemische Untersuchung.

Die elementare Zusammensetzung flüchtiger Öle ist nicht sehr reichhaltig. Ausser Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff kommen nur Stickstoff und Schwefel in Betracht. Die Stickstoffprobe nach Lassaigne war negativ. Dagegen konnte Schwefel in geringer Menge nachgewiesen werden. Mit Natriumnitroprussid wurde zwar keine Reaktion erhalten, es war aus dem Öl durch Erhitzen mit metallischem Natrium kein Natriumsulfid gebildet worden. Als aber 0.5 g Öl einem Cariusaufschluss im Bombenrohr unterzogen wurden, entstand mit Bariumchloridlösung ein sandigweißer Bodensatz. Diese ließ sich durch Glühen mit Natrium- und Kaliumcarbonat als Bariumsulfat identifizieren. Da kein Stickstoff nachzuweisen war, schied die Anwesenheit eines Senföls aus - auch die scharfe Substanz selbst besaß ja keinen Stickstoff - und es waren in dem Öl wohl Sulfide oder Polysulfide enthalten.

Ätherische Öle stellen gewöhnlich Gemische verschiedener flüchtiger organischer Verbindungen dar. Es

sind darin aliphatische, aromatische und hydroaromatische Kohlenwasserstoffe, Alkohole, Aldehyde, Ketone und eine Reihe weiterer Verbindungen enthalten. Typisch sind die Terpene. Durch das Vorhandensein gewisser Inhaltstoffe und durch einen bestimmten Gehalt daran können die einzelnen ätherischen Öle näher charakterisiert werden. Auch das vorliegende Öl wurde auf besondere Einzelbestandteile untersucht.

Prüfung auf freie und gebundene Säure (1). Mit ca.1.5 g Öl wurde nach der DAB.-Methode eine Verseifung durchgeführt. Dabei wurden von 1.6596 g Öl 1.28 ccm n/2-KOH gebunden, was einer Verseifungszahl von 21.64 entspricht.

Durch direkte Titration mit n/2-KOH wurde der Anteil festgestellt, der auf freie Säure zu beziehen ist. 1.4313 g Öl verbrauchten 0.34 ccm n/2-KOH, d.h. die Säurezahl betrug 6.63. Durch Kochen der genau neutralisierten Mischung mit n/2-KOH im Überschuß wurde als Esterzahl 15.68 gefunden. Die auf diese Weise gefundene Verseifungszahl (V.Z.) betrug demnach 22.31 (V.Z. = S.Z. + E.Z.).

Prüfung auf freie Alkohole (1). Eine Probe des Öls wurde in einem Reagenzglas gekocht, welches mit einem Wattebausch verschlossen war. Dieser enthielt einen Fuchsinkristall. Bei Anwesenheit hydroxylhaltiger Stoffe kommt das Fuchsin zur Auflösung; dies konnte bei der vorliegenden Probe nicht festgestellt werden.

Ausserdem wurde eine Acetylierung durchgeführt. 5 g Öl wurden in einem Acetylierungskolben mit 5 g Essigsäureanhydrid erhitzt. Dabei färbte sich das Öl dunkler. 1.4922 g des gewaschenen und acetylierten Öls wurden mit n/2-KOH neutralisiert und sodann verseift. Es wurden 0.80 ccm n/2-KOH gebunden. Dies

---

1) Wasicky, Pharmakognostische Untersuchungen. Teil I, S.183-194 (1936).

entsprach einer Esterzahl von 15.04. Wenn man dieses Ergebnis mit der oben bestimmten Esterzahl verglich, so war kein höherer Wert erhalten worden, es konnte also auch kein Alkohol acetyliert worden sein.

Prüfung auf Phenole (1). Zu 5 ccm Öl wurde in einem Kassia-Kölbchen 3-proz. Natronlauge gegeben, worauf sofort eine voluminöse, seifenartige Abscheidung erfolgte. Das Kölbchen wurde vorsichtig hin und her bewegt und mit 3-proz. Natronlauge aufgefüllt. Um eine klare Scheidung zu erhalten, wurde etwas erwärmt und nach einigem Stehen noch 3.3 ccm Öl abgelesen, sodass 1.7 ccm der vorgelegten Menge mit Natronlauge in Reaktion getreten waren. Die Abscheidung des nicht mit Natronlauge in Verbindung getretenen Öls im Halse des Kassia-Kölbchens ließ sich trotz der angewandten Hilfsmittel nicht einwandfrei bewerkstelligen, sodass eine zuverlässige Angabe, wie weit eine Phenolatbildung eingetreten war, nicht gemacht werden kann.

Prüfung auf Aldehyde (2). Beim Kochen des Öls mit Phenylhydrazin und Eisessig im Wasserbad konnten keine Ausscheidungen festgestellt werden.

Mit ammoniakalischer Silberlösung entstand wohl eine Grauschwarzfärbung, aber kein Silberspiegel. Vielleicht sind in dem ätherischen Öl von Carduus marianus nur Spuren von Aldehyden enthalten, die fast in jedem anderen auch nachgewiesen werden (3).

Kohlehydrate.

In allen Früchten sammelt sich mit zunehmender Reifung eine beträchtliche Menge von Reservestoffen an. Diese bestehen zu einem großen Teil aus Kohlehydraten. Für die therapeutische Wirkung kommen sie kaum in Frage, ausser in glykosidischer Bindung

---

1) Klein, Handbuch der Pflanzenanalyse, Bd.III, 1, S.480 u. 483.
2) Klein, loc.cit., S.483.
3) Gildemeister u. Hoffmann, Die ätherischen Öle. Bd.II, S.480 (1913).

und gelten daher bei der Aufarbeitung der Drogen als störende Ballaststoffe. Bei Carduus marianus war eine große Menge derartiger Stoffe vorhanden.

a) Aus einem Acetonextrakt (siehe S.48) wurden farblose Prismen erhalten, welche mit einem amorphen, gelben, wasserunlöslichen Rückstand vermischt waren. Bei Bestimmung des Mikroschmelzpunktes (1) entwichen unter dem Mikroskop bei ca.110° Blasen, während der Schmelzpunkt bei 146° eintrat (Mittel von 144°, 145°, 147°, 147°). Die Kristalle waren sehr leicht wasserlöslich, mit Fehling'scher Lösung trat Reduktion ein, mit 3 Tropfen 20-proz. Thymollösung und Unterschichten mit konz. Schwefelsäure zeigte sich ein leuchtend roter Ring.

Da aller Voraussicht nach ein aldehydischer Körper, womöglich ein Kohlehydrat vorlag, wurde durch Erhitzen mit Phenylhydrazin und Eisessig auf Osazonbildung geprüft. Dabei wurde ein gelber amorpher Niederschlag erhalten, aus welchem bei dreimaligem Umkristallisieren aus 96-proz.Alkohol und Verdünnen mit Wasser schließlich in rosettenartiger Anordnung schöne gelbe Nadeln ausfielen. Ihr Mikroschmelzpunkt betrug 207.7° (Mittel von 207°, 208°, 208°).

Ein Teil der Lösung der Kristalle wurde mit etwas Bäckereihefe gemischt und 6 Stunden im Gärrohr stehen gelassen; es entstanden Gasblasen von Kohlendioxyd; zur Kontrolle diente ein Ansatz von Hefe + Wasser und ein solcher von Hefe + Dextrose + Wasser.

In den Kristallen des Acetonextrakts lag demnach auf Grund der Schmelzpunkte und der geschilderten Eigenschaften α-d-Glukose vor.

---

1) Verwendet wurde der Apparat nach L.Kofler der Firma Reichert, Wien. Über die Durchführung siehe L.Kofler, Arch.d.Pharm. 270, 293 (1932).

b) Bei einer Destillation von 10 g entfetteter Droge mit 60 ccm 12-proz.Salzsäure erhielt man ein Destillat von brenzligem Geruch, ausserdem schwammen Flocken in der Flüssigkeit, was anzeigte, dass auch der flüchtige Stoff mit übergegangen war. Sobald 5 ccm Destillat gewonnen waren, wurde jeweils mit 5 ccm 12-proz. Salzsäure ergänzt. Mit 30 ccm Destillat wurden folgende Proben angestellt.

Anilinreaktion nach Schiff (1). Mit einigen Tropfen Destillat wurde in einer Mischung gleicher Teile Anilin und Eisessig eine intensive Rotfärbung erzielt.

Phloroglucin-Salzsäureprobe nach W h e e l e r und T o l l e n s (2). Es wurde konz.Salzsäure zugegeben, bis das Destillat 20-proz. salzsauer war. Beim Kochen mit wenig Phloroglucinlösung wurde die Lösung rot, sehr rasch bildeten sich grüne Schlieren, es zeigte sich olivgrüne Färbung und weiterhin schwarz-grüne Ausfällung.

Resorzin-Reaktion nach R o s e n t h a l e r (3). Das Destillat wurde mit gleichen Teilen konz. Salzsäure vermischt und einige Kristalle Resorzin zugegeben. Sodann wurde ein paar Minuten erhitzt; die Lösung wurde blauviolett und mit der Zeit schied sich ein violettschwarzer Farbstoff aus. Mit Eisessig gelöst, ergab sich eine grünschwarze Lösung.

Orzin-Eisenchlorid-Probe nach B i a l (4). 1 ccm Destillat wurde mit 4 ccm Bials-Reagenz erhitzt. Es zeigte sich eine blaugrüne Färbung. Als mit Amylalkohol ausgeschüttelt wurde, ging diese Farbe schön himmelblau in diesen über.

---

1) H.Schiff, Ber.Dtsch.Chem.Ges.20, 540 (1887); Liebigs Ann. 201, 355 (1880).
2) Liebigs Ann. 254, 329 (1889).
3) Ann. 48, 167 (1909).
4) Med. Wschr. 28, 253 (1902).

Durch diese Farbreaktionen wurde das Vorhandensein von Furfurol bewiesen. Dieses war mit den Wasserdämpfen flüchtig gegangen und musste durch Wasserabspaltung aus Pentosen entstanden sein, da Hexosen mit Mineralsäuren nicht flüchtiges Oxymethylfurfurol ergeben. Carduus marianus enthält demnach in reichlicher Menge Pentosen, welche wohl in Form der polymeren Pentosane als Gerüst- und Reservestoffe vorhanden sind.

Amine.

Chemische Untersuchung und biologischer Nachweis.

Wie aus früherer Zeit überliefert wird, wurden Auszüge der Mariendistel mit Erfolg auch bei inneren Blutungen, so vor allem Uterusblutungen, angewandt. Die Verhältnisse wurden in dieser Richtung bereits von U l l m a n n (1) überprüft. Dabei wurde die physiologische Wirksamkeit der Auszüge bestätigt und eine blutdrucksteigernde Wirkung festgestellt. Es gelang auch in einer Aufarbeitung der Droge, welche sich an Arbeiten von B a r g e r , W a l p o l e und D a l e (2) anlehnte, Tyramin zu isolieren, dessen uteruskontrahierende und blutdrucksteigernde Wirkung bekannt ist.

Im Anschluss an U l l m a n n s Arbeitsgang wurde ebenfalls 1 kg entfettete und gepulverte Droge mit 2 Liter Wasser übergossen und 4 Tage lang bei gewöhnlicher Temperatur - wie der Verfasser angibt - stehen gelassen. Dabei wurden schon am dritten Tag Gärungserscheinungen beobachtet, welche rasch zunahmen. Da vor allem primär in den Früchten vorhandenes Tyramin von Interesse war, so schien eine Extraktion ohne

---

1) Biochem.Ztschr. 128, 402 (1922).
2) Barger, Journ. of chem.Soc. London 95, 1123 (1909).- Barger u. Walpole, Journ. of Physiol. 28, 343 (1909).- Barger u. Dale, Biochem.Journ. 2, 286 (1907).

Gärung geeigneter. Deshalb kam beim folgenden Versuch 20-proz.Alkohol zur Anwendung und bei einer dritten Aufarbeitung, bei der wieder Wasser verwandt wurde, Extraktion im Kälteschrank. Auch sonst wurden die Extrakte sorgfältig gekühlt aufbewahrt; denn gerade bei Eiweißstoffen lag die Gefahr der Umwandlung wichtiger Stoffe durch bakterielle Zersetzung nahe. Der erhaltene Preßsaft, ca. 1500 ccm, ergab jeweils sehr starke Reduktion der Fehling'schen Lösung und ebenso eine positive Millon'sche Reaktion. Nach Zugabe von fein gepulvertem Bleiacetat, bis keine Fällung mehr auftrat, wurde filtriert und das klare, schwach gelbe Filtrat im Vakuum auf 250 ccm eingedampft. Die saure Reaktion wurde nun mit Kalilauge bis zur Neutralität abgestumpft und mit 20-proz. Schwefelsäure auf einen Säuregehalt von 5 % eingestellt. Dabei schied sich das überschüssige Bleiacetat als Bleisulfat aus. Der feine weiße Niederschlag wurde abgenutscht und dem Filtrat solange Phosphorwolframsäure zugefügt, bis in einer abfiltrierten Probe keine Fällung mehr entstand; dazu waren etwa 100 g notwendig. Beim Stehenlassen über Nacht schied sich ein grauweißer Bodensatz ab. Die darüberstehende braune Lösung wurde durch eine Nutsche abgetrennt. Nachdem gründlich mit 5-proz. Schwefelsäure nachgewaschen war, kam der Inhalt der Nutsche in ein 600 ccm-Becherglas und wurde mit Wasser zu einem dünnen Brei angeschlämmt. Mit ca. 200 g fein gepulvertem Bariumhydroxyd fand sodann Zerlegung des Niederschlages statt. Dabei entstand Ammoniak, welcher durch 6-stündiges Rühren mit einem mechanischen Rührwerk beseitigt wurde. Alsdann wurden die unlöslichen Bariumverbindungen abfiltriert, aus dem klaren Filtrat überschüssiges Barium durch Fällen mit Kohlendioxyd entfernt und sodann filtriert. Nach Neutralisation wurde die Flüssigkeit im Vakuum auf 50 ccm eingeengt und über Nacht beiseite gestellt. Dieser Arbeitsgang stellte die erste Reinigung dar, im Filtrat war Millons Reagenz nicht positiv. Eine Prüfung des

Filtrats durch die physiologische Methode der Blutdruckbeeinflussung wurde nicht durchgeführt.

Trotzdem die Anzeichen nicht für das Vorhandensein von Tyramin sprachen, wurde die Aufarbeitung nach diesem Stoff weitergeführt, die erhaltene Lösung sodaalkalisch gemacht und 10-mal mit je 50 ccm Amylalkohol ausgeschüttelt. Diese Ausschüttelungen wiederum wurden einzeln mit je 30 ccm 1-proz. Natronlauge geschüttelt, was sich nicht ohne lästige Emulsionsbildung bewerkstelligen ließ. Zum Schluss wurden die gesammelten Amylalkoholportionen nochmals mit 1-proz. Natronlauge ausgeschüttelt. Nach U l l m a n n sollte sich nun das Tyramin in den vereinigten Anteilen der Natronlauge befinden. Diese Lösungsverhältnisse wurden durch einen blinden Versuch bestätigt, indem eine Tyraminlösung, wie oben, ausgeschüttelt wurde. Mit Salzsäure wurde nun bis zur schwachsauren Reaktion versetzt und im Vakuum zur Trockene verdampft. Dabei wurde eine weiße Kristallmasse (Kochsalz) erhalten, die mit einem braunen amorphen Anteil durchsetzt war. Das Salzgemisch wurde mit heißem Alkohol mehrmals ausgezogen und daraus ein braunes Filtrat erhalten. Mit alkoholischer Quecksilberchloridlösung zeigte sich keine Trübung. Daher wurde der Alkohol vollständig entfernt. Dies geschah am Schluss durch Einleiten von Wasserdampf. So wurde ein brauner Rückstand erhalten, welcher auf 20 ccm verdünnt wurde. Er stellte die zweite Reinigungsstufe dar. Millons Reagenz war positiv, ebenso die Mörner'sche Probe, während Folin und Fröhde negativ ausfielen.

Zur weiteren Reinigung wurde 1/2-n. natronalkalisch gemacht und dann 10-mal mit 30 ccm Äther ausgeschüttelt. Der abdestillierte Äther ergab jedoch keinen Rückstand. Dann wurde salzsauer gemacht und anschließend in schwach sodaalkalischer Lösung 20-mal mit 15 ccm Äther ausgeschüttelt. Obwohl Tyramin in Äther selbst nur wenig löslich ist (1), wurden die

---

1) Beilstein, Erg.-Bd. 13/14, S.235.

Ausschüttelungen vom Äther abdestilliert. In dem geringen Rückstand konnte der charakteristische, abstossende Geruch der scharfen Substanz festgestellt werden (siehe S.59). Mit Wasser angeschlämmt, ergab sich keine Millon-Reaktion. Beim Schütteln mit Alkali und Benzoylchlorid hinterblieb ein amorpher Rückstand, der auch nach Umkristallisieren aus heißem Alkohol keinen eindeutigen Schmelzpunkt ergab. Die mit Äther ausgeschüttelte braune Lösung ergab die Millon'sche Reaktion schwach positiv. Auch hieraus wurde jedoch nach Schotten-Baumann kein einwandfreies benzoyliertes Produkt erhalten.

Es konnte also nach dieser Methode kein eindeutiger Beweis von Tyramin erbracht werden. Das hauptsächlichste Reagenz, auf das sich die Untersuchungen stützten, war die Millon'sche Probe. Wie Nachprüfungen ergaben, konnte jedoch diese Reaktion durch gewisse Bedingungen hintangehalten werden. Es wurde gefunden, dass das Reagenz zuverlässig nur bei schwach sauren und schwach alkalischen Lösungen wirkt. Chlorionen stören, worauf wohl der negative Ausfall nach der ersten Reinigung zurückzuführen war. Erschwerend bei der Millon'schen Reaktion war ausserdem, dass die untersuchten Lösungen oft trübe und gelb bis braun gefärbt waren, sodass Farbunterschiede und Niederschlagsbildungen schwer zu erkennen waren. Vor allem konnte auch der in Carduus marianus vorliegende Farbstoff zu Täuschungen Anlass geben, da er mit dem salpetersauren Reagenz auch eine Rotfärbung ergibt. Es war also dringend erforderlich, die Rotfärbungen mit Proben zu vergleichen, welche mit geringen Mengen Tyramin versetzt waren; dabei zeigten die aus der Drogenaufarbeitung erhaltenen Färbungen wenig Übereinstimmung. Sie waren gewöhnlich nicht sehr ausgeprägt; es war auffallend, dass bei zunehmender Anreicherung die Probe nicht deutlicher wurde.

U l l m a n n machte über die Menge des erhaltenen Tyramins keine genauen Angaben. Er berichtete nur, dass das verbleibende Extrakt nach dem Verdünnen in seiner Wirkung einer 1-proz.Tyramin-Hydrochloridlösung entsprochen hätte; dies entspräche bei einer Verdünnung auf 10 ccm schon einem Gehalt von 0.01 %.

Da die Millon'sche Reaktion die genannten Schwierigkeiten zeigte, wurde mit der übrig gebliebenen braunen Lösung, welche vermutlich das Tyramin enthielt, die Pauly'sche Diazoreaktion angestellt. Hierbei ergeben sich für Tyrosin und Tyramin ebenfalls spezifische Färbungen. Modifiziert wurde diese Reaktion durch G e b a u e r und F ü l l n e g g (1), welche statt Diazobenzolsulfosäure diazotiertes p-Nitranilin vorschlugen. In einem Reagenzglas wurde 1 ccm 1/2-proz. p-Nitranilinlösung mit 1 ccm 1/2-proz. Natriumnitritlösung versetzt und unter Eiskühlung 1/2 ccm Salzsäure (1 + 1) zugegeben und bis zur Entfärbung der gelben Lösung geschüttelt. Nach Zugabe von 5 ccm der zu untersuchenden Lösung wurde die Mischung möglichst stark abgekühlt und sodann durch Zutropfen von 20-proz. Natriumcarbonatlösung alkalisiert. Dabei bildeten sich rotbraune Schlieren, schließlich erschien die ganze Lösung leuchtend rotbraun. Der Farbstoff wurde in einem Scheidetrichter mit einer Mischung von Butylalkohol-Pyridin (9 + 1) ausgeschüttelt. Während die erste Ausschüttelung fast leuchtend rot war, zeigten die beiden folgenden einen mehr braunen Ton. Es handelte sich also um keinen einheitlichen Farbstoff, sondern es mussten verschiedene Produkte gekuppelt worden sein. In einem blinden Versuch wurde mit Tyramin ein braunroter Farbstoff erhalten, welcher mit rein brauner Farbe in den Butylalkohol überging. Mit Histamin wurde eine leuchtend rote Färbung erzielt. Bei einer Mischung von 1 ccm einer 0.05-proz. Tyraminlösung mit 1 ccm einer 0.05-proz. Histaminlösung zeigte

---

1) Ztschr.physiol.Chem. 191, 222 (1930).

der Butylalkohol eine Mischfarbe, bei der das Rot jedoch überwog, ein Zeichen, dass die Farbwirkung des gekuppelten Histamins stärker war. Mit 0.2 ccm Histamin- auf 1 ccm Tyraminlösung kam das Braun des Tyramins mehr zur Geltung.

Die Auswertung dieser Farbreaktionen bedeutete, dass in dem untersuchten Extrakt Tyramin vorhanden war, erkenntlich an der braunen Tönung. Weiterhin musste jedoch auch auf die Anwesenheit von Histamin geschlossen werden, sodass an der von anderen Autoren beobachteten blutdrucksteigernden Wirkung wohl beide Amine beteiligt waren. Die Empfindlichkeit dieser Reaktion soll bis zu 1 γ Histamin gehen.

Da für Histamin eine chemische Darstellung noch schwieriger ist - sein Vorkommen erstreckt sich gewöhnlich nur auf ganz geringe Mengen -, wurde für die vorliegende Untersuchung auch eine biologische Nachweismethode herangezogen. Dafür eignet sich die tonussteigernde Wirkung auf die glatte Muskulatur überlebender Organe, speziell des Uterus und des Meerschweinchendünndarms. Mit diesen Testobjekten lässt sich Histamin noch in einer Konzentration von 1 : 3.10^8 (1/300 γ/ccm) nachweisen. Am Meerschweinchendünndarm zeigen sich mit Histamin Kontraktionen, welche im Kurvenbild durch einen steilen, für Histamin charakteristischen Anstieg und Abfall zum Ausdruck kommen. Nach G u g g e n h e i m und L ö f f l e r (1) bewirkt auch Tyramin am Meerschweinchendünndarm Kontraktionen, doch berichten F o r s t und W e e s e (2), dass die Reizschwelle des Tyramins oberhalb $1:10^6$ liegt. Um also gegenüber Histamin noch in Erscheinung zu treten, müsste das Tyramin in 100-facher Konzentration in der Pflanze enthalten sein. Sobald eine genügende Verdünnung gewählt ist, tritt jedenfalls eine Tyramin-

---

1) Biochem.Ztschr. 72, 303-304 (1916).
2) Arch.f.exper.Pathol.u.Pharmakol. 117, 3/4, 235 (1926).

wirkung nicht mehr in Erscheinung. Im Verlauf der selbst durchgeführten Untersuchungen wurde beobachtet, dass namentlich bei Zugabe großer Dosen von Tyramin, ca. 500-2500γ , keine Kontraktion, sondern sehr oft Blockierung erfolgte. Zur Anwendung kam die Trendelenburg'sche Methode, bei der ein Stück Dünndarm in Tyrodelösung aufgehängt wurde. Mit einem Zeiger wurden die Bewegungen des Darms auf angeschwärztes Papier übertragen. Die Versuchskurven sind in die Arbeit nicht mitaufgenommen, da sie in den Rahmen der pharmakologischen Überprüfung der Mariendistel gehören.

Für die physiologische Prüfung wurden 3-mal je 10 g entfettete Droge aufgearbeitet und dabei ein Verfahren nach B. B l e y e r , W. D i e m a i r , F. F i s c h l e r und K. T ä u f e l (1) benutzt, das zur Isolierung von Histobasen dient. Mit 80 ccm 33-proz.Schwefelsäure wurde 5 Stunden lang über freier Flamme hydrolysiert. Dann wurde filtriert; es hinterblieb eine schwarze Schmiere von scharfem, an Holzteer erinnernden Geruch, welche wiederholt mit Wasser ausgewaschen wurde. Das braune Filtrat wurde mit Bariumhydroxyd neutralisiert, vom entstandenen Bariumsulfat abfiltriert und die erhaltene Lösung im Vakuum auf 50 ccm eingeengt. Die Lösung wurde nun mit 10 ccm konz. Salzsäure angesäuert und mit 50 ccm 20-proz.Phosphorwolframsäure gefällt. Durch Erwärmen auf dem Wasserbad sollte der Hauptteil der Fällung wieder in Lösung gebracht werden; dann wurde abgekühlt. Nachdem der Niederschlag 48 Stunden im Kälteschrank gestanden hatte, zeigte sich ein schmieriger Bodensatz und ein lockerer, gelbbrauner Niederschlag. Der gesamte Rückstand wurde auf einem gehärteten Filter gesammelt und mit einer Mischung aus 2.5 % Phosphorwolframsäure und 2.5 % Salzsäure ausgewaschen. Dieser die Basen enthaltende Niederschlag wurde dann mit 250 ccm Wasser in einem 500 ccm Scheidetrichter übergespült. Nach Zusatz von 10 ccm konz.Salzsäure er-

1) Biochem.Ztschr. 286, 410 (1936).

folgte dreimalige Ausschüttelung mit einer Mischung von Amylalkohol-Äther (1+1). Die Amylalkohol-Äther-Auszüge, welche Verunreinigungen beseitigen sollten, wurden nochmals mit Wasser und dieses wieder mit Amylalkohol-Äther ausgeschüttelt. Die wässrigen Anteile, welche die Amine enthielten, wurden vereinigt und filtriert und eine Probe mit Barytwasser versetzt, ohne dass eine Fällung mit noch vorhandener Phosphorwolframsäure erfolgte. Sodann wurde im Vakuum auf ca. 30 ccm eingedampft, wobei noch gelöster Amylalkohol und Salzsäure entwichen, und in einem Meßkolben auf 50 ccm aufgefüllt. Für die physiologische Bestimmung wurde der saure Auszug durch Abstumpfen mit Kalilauge auf p_H 7,0 gebracht. Zur Kontrolle diente Azolithminpapier.

In der erhaltenen Lösung wurde zunächst die oben beschriebene Kupplungsreaktion mit p-Nitranilin durchgeführt. Dabei ergaben sich in allen drei Fällen schöne Färbungen, die - wie oben - keine Einheitlichkeit aufwiesen, sondern eine Rotfärbung mit braunem Unterton darstellten. Mit Butylalkohol-Pyridin konnte keine vollständige Ausschüttelung der wässrigen Schicht erreicht werden. Die letzten Ausschüttelungen waren gleichmäßig braun, während in der wässrigen Schicht ein roter Anteil zurückblieb. Nach G e b a u e r und F ü l l n e g g (loc.cit.) deutet dies auf Tyrosin hin, welches sich im Gegensatz zu den Histobasen nicht vollständig extrahieren lässt. Mit dem Amin kommt ja gewöhnlich auch die Säure im Pflanzenkörper vor, aus der das Amin sehr wahrscheinlich durch Decarboxylierung gebildet wird.

Bei der physiologischen Wertbestimmung wird nur das Amin erfasst. Am Meerschweinchendünndarm zeigten sich die für Histamin charakteristischen Ausschläge, wobei die zweite Droge den stärksten Kurvenanstieg aufwies.

Zum Schluss soll noch eine für Histamin spezifische Farbreaktion nach W. Z i m m e r m a n n (1) Erwähnung finden. 3 ccm eines Drogenauszuges (1:20) wurden mit 3 Tropfen 1-proz. Kobaltnitratlösung versetzt und dazu 10 Tropfen 2-n. Natronlauge gegeben. Es zeigte sich ein schmutzigblauer bis violetter Bodensatz. Bei einem blinden Versuch, bei dem eine Spur Histamin zugegeben wurde, trat dieselbe Färbung ein. Sie hielt sich beim Schütteln, im Gegensatz zu der Blaufärbung, die entstand, wenn man nur Kobaltnitrat mit Natronlauge mischte. Mit einer Histaminlösung in größerer Konzentration wurde eine wunderbar violette Färbung erhalten. Die Reaktion beruht in einer Komplexbildung des Histamins, welche allerdings gegen Oxydationsmittel und Reduktionsmittel empfindlich sein soll.

Zusammenfassend konnte in Carduus marianus das Vorkommen von Tyramin bestätigt werden. Durch die Farbreaktion sowie den biologischen Test konnte als zweites Amin das Histamin festgestellt werden, welches ebenfalls an der blutdrucksteigernden und uteruskontrahierenden Wirkung der Drogenauszüge beteiligt sein dürfte. Über die Konzentration dieser Amine in der Pflanze kann nichts ausgesagt werden, doch ist anzunehmen, dass sie nur in sehr geringen Mengen vorkommen.

---

1) Ztschr.f.physiol.Chem. 186, 260 (1930).

Zusammenfassung.

1) Die Durchführung von Vorproben bei Fructus Cardui Mariae ergab Hinweise auf eine Reihe therapeutisch wichtiger Stoffe, so vor allem auf Alkaloide, Glykoside, Saponine und Gerbstoffe. Im Zusammenhang damit fiel der bittere Geschmack bestimmter Lösungen auf. Bei der Wasserdampfdestillation ergab sich ein flüchtiges Öl. Der Befund der Vorproben war richtungweisend für die folgenden Untersuchungen.

2) Bei einer quantitativen Aufarbeitung der Droge, bei der Wassergehalt, Asche, fettes Öl, Eiweiß und die Rohfaser bestimmt wurde, konnte das in der Frucht bis zu 26 % enthaltene fette Öl näher beschrieben werden.

3) Mit den durchgeführten Alkaloidisolierungsmethoden konnten keine Alkaloide aufgefunden werden, ebenso sind keine Saponine in der Pflanze enthalten.

4) Wenn Glykoside vorhanden sind, so scheinen sie nur in geringer Menge vorzuliegen, da die Bourquelot'-sche Methode zu keinem einwandfreien Nachweis führte.

5) Die Prüfung auf Gerbstoffe ergab geringe Mengen eines Catechingerbstoffs, der für eine therapeutische Wirkung wohl kaum herangezogen werden kann.

6) Da Alkaloide und Gerbstoffe ausschieden, wurde nach anderen Methoden eine Darstellung des bitteren Prinzips versucht. Dazu fand die Bleimethode, ein Tanninverfahren, Adsorption mit Tierkohle und die chromatographische Adsorptionsanalyse Anwendung. Am meisten befriedigte jedoch direkte Extraktion mit organischen Lösungsmitteln. Dabei wurden mit Aceton, Chloroform, Methylalkohol und Essigester gelbe bis gelbbraune harzige Rückstände erhalten, die in 45-proz.Alkohol löslich waren und bitter schmeckten. Die Rückstände waren aber nicht ein-

heitlich. Das günstigste Ergebnis versprach eine Extraktion der Fruchtschalen, die als Träger des Bitterstoffs angesehen werden müssen, mit Chloroform. Wenn der erhaltene Rückstand zur Beseitigung eines öligen Anteils kurz mit Äther geschüttelt wurde, so hinterblieb eine gelbe, harzige Masse, die beim Auflösen in 45-proz.Alkohol harzig bitter schmeckte. Sie enthielt keinen Stickstoff und war unlöslich in Säuren und kaltem Wasser, beim Kochen mit Wasser blieb eine milchig-getrübte, bitterschmeckende Lösung, wie auch durch Auskochen der Schalen mit Wasser eine trübe bittere Lösung erhalten wurde. Auf Zusatz von 45-proz.Alkohol und auch von Kalilauge erfolgte klare Lösung. Der fragliche bittere Stoff zeigte den Charakter einer Harzsäure. Eine weitere Anreicherung gelang nicht. Auch direkte Extraktion mit 96-proz.Alkohol ist geeignet, nur muss dann mit Äther oder Chloroform eine Ausfällung von Verunreinigungen erfolgen.

Im Verlauf der Aufarbeitung der Droge ergaben verschiedene ätherische Lösungen stickend riechende Rückstände. Es stellte sich heraus, dass diesen Rückständen eine überaus scharf schmeckende Substanz zugrunde lag, die am besten durch langsames Eindunsten ätherischer Extrakte erhalten werden kann. Doch hat zur Beseitigung einschließender Verunreinigungen eine Vorextraktion mit Aceton und Chloroform zu erfolgen. Die Substanz war Stickstoff-frei und wurde näher beschrieben. Sie zeigte sich physiologisch wirksam. Wie die Wasserdampfdestillation ergab, schien sie in Zusammenhang mit dem gefundenen ätherischen Öl zu stehen, das als sekundäre Bildung anzusehen ist. Wahrscheinlich liegt hier ein Stoff in glykosidischer Bindung vor, der wasserunlöslich ist.

Bei Wasserdampfdestillation der Droge wurde ein ätherisches Öl in einer Konzentration von etwa 0.1 % erhalten. Auch verschiedene Extrakte ergaben diesen

flüchtigen Stoff. In einem Großversuch wurde eine größere Menge dieses Öles gewonnen und davon die wichtigsten physikalischen und chemischen Kennzahlen festgelegt. Die Untersuchungen berechtigen zu dem Schluss, dass das ätherische Öl eine sekundäre Bildung darstellt und erst durch Spaltung bei der Destillation entsteht.

9) An Reservestoffen konnte aus einem Acetonextrakt α-d-Glukose nachgewiesen und identifiziert werden. Ebenso sind Pentosane in reicher Menge vorhanden.

10) Durch Farbreaktionen konnte das Vorhandensein von Tyramin bestätigt werden. Ausserdem wurde durch chemische Reaktionen auch die Anwesenheit von Histamin sichergestellt, das weiterhin durch biologischen Test nachgewiesen werden konnte.

11) Als Sitz des Bitterstoffs, der scharfen Substanz, wie des ätherischen Öles kommen die Fruchtschalen in Betracht, weshalb diese für eine dahingehende Aufarbeitung als Ausgangsmaterial empfohlen werden. Ausserdem enthalten die Schalen noch einen Farbstoff, der Indikatoreigenschaften zeigt.

12) Zusammenfassend führten die Bestrebungen, aus Fructus Cardui Mariae das wirksame Prinzip zu isolieren, nicht zu einem einheitlichen Stoff, der durch Kristallisation und Schmelzpunkt hätte charakterisiert werden können. Es muss vielmehr in Carduus marianus ein Zusammenwirken einer Reihe wichtiger Inhaltstoffe angenommen werden. Auf Grund der vorliegenden Arbeit können dafür ein bitteres Prinzip, eine scharfe Substanz, sowie ein ätherisches Öl in Betracht gezogen werden. Ausserdem sind die biogenen Amine, Tyramin und Histamin, wahrscheinlich an einer Wirkung beteiligt. Es ist Sache einer pharmakologischen Überprüfung, diejenigen Verbindungsgruppen der genannten Art festzustellen, die mit Sicherheit für die therapeutische Wirkung in Betracht kommen. Erst nach Vornahme dieser Untersuchungen erscheint eine weitere pharmazeutisch-chemische Behandlung der Mariendistel lohnend.

Lebenslauf.

Als Sohn des Apothekers Dr. Eugen Berg und seiner Ehefrau Anna, geb. Rau, wurde ich am 8. Juli 1910 in Geislingen Stg. geboren. Dort besuchte ich von 1917 bis 1920 die Volksschule und bis Frühjahr 1929 das Realgymnasium, worauf ich im März 1929 die Reifeprüfung ablegte. Dann folgte in der Kellerschen Apotheke in Tübingen meine praktische Ausbildung als Apotheker, welche im März 1931 durch das pharmazeutische Vorexamen ihren Abschluss fand, und das Assistentenjahr in der Johannesapotheke in Stuttgart. Im Sommersemester 1932 bezog ich die Universität München, um mich dem Studium der Pharmazie zu widmen. Im selben Jahr verlor ich meinen Vater durch den Tod. Das Pharmazeutische Staatsexamen legte ich im Oktober 1934 ab. Anschließend arbeitete ich anorganisch- und organisch-chemisch weiter. Die Approbation als Apotheker erhielt ich im Herbst 1936. Seit Sommersemester 1936 bin ich mit der vorliegenden Arbeit beschäftigt.